

NÁDIA SABRINA MARIANO

**ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR
ALÉRGICA EM RATOS EXPOSTOS À ENTEROTOXINA
ESTAFILOCÓCICA DO TIPO A (SEA)**

Campinas

2009

**ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR
ALÉRGICA EM RATOS EXPOSTOS À ENTEROTOXINA
ESTAFILOCÓCICA DO TIPO A (SEA)**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.
Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Co-orientador(a): Profa. Dra. Ivani Aparecida de Souza

Campinas

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M337e	Mariano, Nádia Sabrina Estudo da resposta inflamatória pulmonar alérgica em ratos expostos à enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) / Nádia Sabrina Mariano. Campinas, SP : [s.n.], 2009. Orientadores : Edson Antunes, Ivani Aparecida de Souza Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Staphylococcus aureus. 2. Inflamação pulmonar. 3. Eosinófilos. 4. Eotaxina. 5. Medula óssea. I. Antunes, Edson. II. Souza, Ivani Aparecida de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.
-------	---

Título em inglês : Study of pulmonary allergic inflammation in rat after airway exposition to staphylococcal enterotoxin type A (SEA)

Keywords:

- *Staphylococcal aureus*
- Lung inflammation
- Eosinophils
- Eotaxin
- Bone Marrow

Titulação: Mestrado em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. Edson Antunes

Prof^a. Dr^a. Wirla Maria da Cunha Tamashiro

Prof^a. Dr^a. Soraia Kátia Pereira Costa

Data da defesa: 23-07-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Nádia Sabrina Mariano

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Edson Antunes

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Soraia Kátia Pereira Costa

Professor (a) Doutor (a) Wirla Maria Da Silva Cunha Tamashiro

Professor (a) Doutor (a) Edson Antunes

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/07/2009

DEDICATÓRIA

*A Deus, por ter me concedido vida e saúde,
e por me prover da força necessária para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.*

*Aos meus queridos Pais, Vera Lúcia Villas Boas Mariano e Claudionor Mariano, que
sempre me incentivaram a buscar o conhecimento e carinhosamente me acompanharam
durante todo esse tempo.*

*Obrigada por terem renunciado a seus sonhos em favor dos meus!
Ao meu amado esposo que sempre me doou amor, forças e principalmente compreensão.*

*A todos àqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes
realizações.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela orientação, amizade e oportunidade de trabalhar em seu grupo, onde pude aprender e crescer muito. Todo meu respeito e admiração.

À Profa. Dra. Ivani Aparecida de Souza, pelo empenho como co-orientadora, pelos ensinamentos, dedicação e amizade. Sinto-me privilegiada por ter tido a oportunidade de lhe conhecer e trabalhar com você.

À Profa. Dra. Angelina Zanesco, através de quem vim a este departamento, pelo apoio e por sempre ter apostado em mim. Obrigada por ter me dado a oportunidade e ter me colocado junto de profissionais excepcionais.

Ao grande amigo e colaborador Enilton Aparecido Camargo, pela ajuda, paciência e apoio na realização do trabalho. Meu eterno e sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. André Schenka, pela colaboração e fornecimento das análises histológicas presentes neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, à Profa. Dra. Wirla Tamashiro e ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro, pela participação no exame de qualificação, no qual puderam apresentar valiosas sugestões para revisão deste trabalho.

Aos docentes e pós-graduandos do Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do depto de farmacologia da UNICAMP, Francileuda, Elaine, Wanderlei, Marcos, Agnaldo, Adilson e Toninho, pela agradável convivência e pelos serviços prestados. E especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva por dispensar tanto cuidado na criação dos ratos.

À todos os amigos do Departamento de Farmacologia, especialmente do laboratório do Prof. Dr. Edson Antunes e Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela convivência e troca de experiência durante todos esses anos.

Aos meus queridos amigos Gláucia Coelho de Mello, Tatiane Ferreira, Ivani de Souza e Enilton Camargo pela força, ajuda, companheirismo, pelos ensinamentos e por terem amenizado vários momentos difíceis. O dia-a-dia de trabalho sem vocês certamente não teria graça.

Aos grandes amigos que aqui conquistei, em especial, Luís Gustavo Souza, Giovana Gomes, Adriana Rampazio, Mônica Ruzon, Letícia Lintomem, Lineu Baldissera, Priscila Monteiro, Marina Calixto, Dalize Squebola, Maria Andréia Delbin, Fernando Bau, Mário Ângelo Claudino, Carla Penteado, Cristiane Freitas, Fabíola Mônica, Fernanda Priveiro, Luciana Alves, Fernanda Datti, Marcelo Datti, Haroldo Flores, Juliana Baracat, Rafael Annovazi, Rafael Prada, Elen Landucci, Sisi Marcondes, Elionai, Cássia Saccon e Renata Scatamburlo. Obrigada pela maravilhosa convivência.

A toda a minha família, em especial, meu pai Claudionor, minha mãe Vera e minha irmã Nara.

Ao meu querido esposo Reginaldo, pela paciência, compreensão, apoio e carinho dispensados durante toda a realização do meu trabalho.

À minha querida tia Tê pelo amor e apoio. Sua cumplicidade e lealdade são muito importantes para mim.

À minha amiga de longa data, Daniele Palomo, pelo apoio e alegria que amenizou vários momentos difíceis. Agradeço toda a força e amizade que me dá a certeza de poder contar sempre com você!

À minha querida amiga Luciane Avanzi pela amizade e pelos bons conselhos. Sua sensibilidade e alto astral são contagiantes!

Aos motoristas do ônibus fretado pela Prefeitura Municipal de São João da Boa Vista, Clóvis e Hailton. Muito obrigada pelo carinho e compreensão de vocês, e é claro, pelas caronas.

À UNICAMP, pela oportunidade de crescimento científico e profissional nesta conceituada instituição.

À FAPESP, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo imprescindível apoio financeiro.

Aos animais, que solicitados pela Ciência, contribuíram involuntariamente com suas vidas em prol desta pesquisa. O meu respeito e a minha gratidão.

OBRIGADA.

“Botas...as botas apertadas são uma das maiores venturas da terra, porque, fazendo doer os pés, dão azo ao prazer de as descalçar.”

(Machado de Assis)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	xiv
Lista de materiais.....	xvi
Lista de figuras.....	xvii
Lista de tabelas.....	xix
Resumo.....	xx
Abstract.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Asma alérgica.....	23
1.2. Asma e eosinófilos.....	26
1.3. Asma e fatores de exacerbação	30
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> e enterotoxinas estafilocócicas	32
1.5. Resposta inflamatória pulmonar produzida por enterotoxinas estafilocócicas.....	35
1.6. Objetivos Gerais	37
1.7. Estratégias experimentais.....	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1. Animais.....	39
2.2. Sensibilização e desafio dos animais com ovalbumina (OVA).....	39
2.3. Protocolos experimentais.....	39
2.3.1. Pré-exposição à SEA.....	39
2.3.2. Pós-exposição à SEA.....	40
2.3.3. Pré-exposição ao LPS.....	40
2.4. Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA) e contagem de leucócitos.....	40
2.5. Coleta de sangue e plasma	41
2.6. Contagem de leucócitos na medula óssea	42
2.7. Análise morfológica de pulmões de ratos sensibilizados e pré-exposição à SEA.....	43
2.8. Quantificação dos níveis de eotaxina, TNF- α , IL-10 no LBA	43
2.9. Estimulação com SEA de macrófagos alveolares isolados de ratos naïve e cultivados in vitro.....	44
2.10. Análise estatística.....	44
3. RESULTADOS.....	45

3.1.	Efeito do desafio antigênico com OVA sobre o número de leucócitos obtidos no LBA de ratos sensibilizados e não sensibilizados.....	46
3.2.	Efeito da pré-exposição das vias aéreas à SEA sobre o número de leucócitos no LBA.....	48
3.3.	Efeito da pré-exposição das vias aéreas à SEA sobre o número de leucócitos pre- sentes no parênquima pulmonar.....	51
3.4.	Efeito da pós-exposição das vias aéreas à SEA sobre o número de leucócitos obtidos no LBA.....	54
3.5.	Efeito da pré-exposição das vias aéreas ao LPS sobre o número de leucócitos obtidos no LBA	55
3.6.	Efeito da pré-exposição das vias aéreas à SEA sobre o número de leucócitos no sangue periférico.....	57
3.7.	Efeito da pré-exposição das vias áreas à SEA sobre o número de leucócitos na medula óssea.....	59
3.8.	Efeito da pós-exposição das vias áreas à SEA sobre o número de leucócitos na medula óssea.....	61
3.9.	Efeito da pré-exposição das vias aéreas à SEA sobre os níveis de eotaxina, TNF- α e IL-10 presentes no LBA obtido após desafio antigênico com OVA (24h).....	63
3.10.	Efeito da estimulação com SEA sobre os níveis de eotaxina em macrófagos alveolares cultivados in vitro.....	65
4.	DISCUSSÃO.....	66
5.	CONCLUSÕES.....	72
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
7.	ANEXO.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	célula apresentadora de antígeno
BAL	lavado broncoalveolar
CCL2	quimiocina tipo 2
CCL7	quimiocina tipo 7
CCL22	quimiocina tipo 22
CCR1	receptor de quimiocina tipo 1
CCR3	receptor de quimiocina tipo 3
CO₂	gás carbônico
COX	ciclooxigenase
C3aR	fator do sistema complemento
C/EBP	fator de transcrição
ECP	proteína catiônica do eosinófilo
EDN	neurotoxina derivada do eosinófilo
EPM	erro padrão da média
EPO	peroxidase eosinofílica
ERK2	cinase ativada por receptor extracelular tipo 2
FcεRI	receptor Fcε tipo I
FcγRII	receptor Fcγ tipo II
FcαRI	receptor Fcα tipo I
GATA-1	fator de transcrição
GM-CSF	fator estimulante de colônia granulócito-macrófago
H-E	hematoxilina-eosina
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgE	imunoglobulina E
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
INF-γ	interferon-gama
LBA	lavado broncoalveolar

LPS	lipopolissacarídeo
LTC₄	leucotrieno C ₄
LTB₄	leucotrieno B ₄
Mac-1	macrophage-1 antigen
MAd-CAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MAP-kinase	proteína cinase ativada por mitógeno
MBP	proteína básica principal
MCP-1α	proteína quimioatraente de monócito-1
MHC-class II	complexo de histocompatibilidade de classe II
MMP-9	metaloproteinase do tipo 9
NO	óxido nítrico
OVA	ovalbumina
PAF	fator de ativação de plaquetas
PBS	tampão salina-fosfato
PGE₂	prostaglandina E2
PU-1	fator de transcrição
RANTES	reguladas pela ativação, expressas e secretadas pelas células T normais
RNA_m	ácido ribonucléico do tipo mensageiro
SEA	enterotoxina estafilocócica do tipo A
SEB	enterotoxina estafilocócica do tipo B
SEs	enterotoxinas estafilocócicas
TCR	receptor de célula T
TH₁	linfócitos T auxiliares do tipo 1
TH₂	linfócitos T auxiliares do tipo 2
TGF-β	fator de crescimento-beta
TLR-4	toll-like receptor-4
TNF-α	fator de necrose tumoral-alfa
TSST-1	toxina da síndrome do choque séptico-1
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	very late antigen-4

LISTA DE MATERIAIS

<u><i>Susbtância</i></u>	<u><i>Procedência</i></u>
Ácido acético glacial	J.T.Baker (Eldorado, México)
Álcool (70% - 100%)	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Al(OH)₃	Sanofi-synthelabo (Rio de Janeiro, Brasil)
BSA	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
CaCl₂.H₂O	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Cristal de violeta	Merck (Darmstadt, Alemanha)
Formaldeído (37%)	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
Glicose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Halotano	Cristália Pr. Quím. Far. (Itapira, Brasil)
HCl	CETUS (Santo Amaro, Brasil)
H-E	Laboclin Ltda (Pinhais, Brasil)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
KH₂PO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Kit colorimétrico proteico	Bio Rad™ (Hercules, EUA)
Kit rat IL-10	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit mouse Eotaxina	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
Kit rat IgE	Shibayagi Co. Ltd. (Gunma, Japão)
Kit TNF-α de rato	R&D Systems™ (Minneapolis, EUA)
LPS	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
MgSO₄.7H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
NaH₂PO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂HPO₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂HPO₄.H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂HPO₄.2H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Na₂HPO₄.7H₂O	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Óleo de imersão p/ microscopia	Merck (Darmstadt, Alemanha)
OVA (grau III)	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Solução fisiológica 0,9%	EQUIPLEX® (Aparecida de Goiânia, Brasil)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (1 e 3 ng) no influxo de eosinófilos para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pela ovalbumina (OVA) em 24 h.

Figura 2. Análise histológica do tecido pulmonar de ratos submetidos a pré-exposição das vias aéreas com SEA e desafiados com ovalbumina (OVA).

Figura 3. Efeito da pós-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (3 ng) no influxo de eosinófilos para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pela ovalbumina (OVA) em 24 h.

Figura 4. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao LPS (0,1 e 1 µg) sobre o influxo de neutrófilos (painel A), eosinófilos (painel B) e células mononucleares (painel C) para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pela ovalbumina (OVA) em 24 h.

Figura 5. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (3 ng) sobre o número de leucócitos totais (painel A), eosinófilos (painel B), neutrófilos (painel C) e células mononucleares (painel D) no sangue periférico obtido após o desafio antigênico com ovalbumina OVA em 24 h.

Figura 6. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (3 ng) no número de neutrófilos e eosinófilos presentes na medula óssea de ratos desafiados com ovalbumina (OVA) em 24 h.

Figura 7. Efeito da pós-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (3 ng) no número de neutrófilos e eosinófilos presentes na medula óssea de ratos desafiados com ovalbumina (OVA) em 24 h.

Figura 8. Níveis de eotaxina (painel A), TNF- α (painel B) e IL- 10 (painel C) no lavado broncoalveolar (LBA de ratos pré-expostos à SEA e submetidos ao desafio antigênico com ovalbumina (OVA).

Figura 9. Níveis de eotaxina em sobrenadante de macrófagos alveolares estimulados com SEA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de leucócitos encontrados no lavado broncoalveolar (LBA) de ratos sensibilizados obtido 12, 24 e 48 h após desafio antigênico com ovalbumina (OVA).

Tabela 2. Número de neutrófilos e células mononucleares encontrados no lavado broncoalveolar (LBA) de ratos pré-expostos à SEA (1 e 3 ng) obtido 24 h após desafio antigênico com ovalbumina (OVA).

Tabela 3. Número de leucócitos no parênquima pulmonar de ratos pré-expostos à SEA (3 ng) em 24 h após desafio antigênico com ovalbumina (OVA).

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um tipo de bactéria gram-positiva que produz e secreta uma série de enterotoxinas com propriedade imunomoduladoras. Entretanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos na exacerbação do influxo celular observado em indivíduos asmáticos expostos a enterotoxinas estafilocócicas. O objetivo desse trabalho é investigar os efeitos da exposição das vias aéreas à enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) sobre o recrutamento de leucócitos para o pulmão de ratos sensibilizados e desafiados com ovalbumina (OVA). Em nossos protocolos experimentais, ratos foram expostos à SEA 4 h antes ou 4 h após o desafio antigênico com OVA. O lavado broncoalveolar (LBA), a medula óssea e o tecido pulmonar foram obtidos 24 h após o desafio com OVA. A pré-exposição à SEA aumentou significativamente o número de eosinófilos no LBA e no tecido pulmonar de ratos desafiados com OVA, enquanto que o número de neutrófilos e células mononucleares não foi significativamente alterado. Na medula óssea, a pré-exposição à SEA isoladamente aumentou significativamente o número de eosinófilos, sendo esse aumento potencializado em ratos desafiados com OVA. Por outro lado, a pós-exposição à SEA não afetou o número de eosinófilos, neutrófilos ou células mononucleares observadas no LBA. A pré-exposição ao LPS em animais desafiados com OVA aumentou somente o número de neutrófilos no LBA. No LBA de ratos pré-expostos à SEA e desafiados com OVA, notamos uma elevação significativa nos níveis de TNF- α e eotaxina, mas não de IL-10. Os níveis de eotaxina presentes em sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares tratados com SEA *in vitro* aumentaram cerca de 3 vezes em relação a macrófagos não estimulados com SEA. Concluimos que a pré-exposição (mas não a pós-exposição) das vias aéreas de ratos à SEA aumenta seletivamente o número de eosinófilos presente no LBA, tecido pulmonar e medula óssea de ratos desafiados com OVA por mecanismos que envolvem o aumento na síntese de TNF- α e eotaxina.

ABSTRACT

Gram-positive *Staphylococcus aureus* releases classical enterotoxins which aggravates allergic airway diseases. However, little is known about the mechanisms underlying the cell influx exacerbation in asthmatic individuals under exposure to Staphylococcal enterotoxins. We therefore aimed to investigate the effects of airways exposure to Staphylococcal enterotoxin A (SEA) to pulmonary leukocyte recruitment in rats sensitized and challenged with ovalbumin (OVA). Rats were exposed to SEA at 4 h prior to OVA challenge or at 4 h post-OVA challenge. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, bone marrow and lung tissue were obtained at 24 h after OVA challenge. Pre-exposure to SEA markedly enhanced the eosinophil counts in both BAL fluid and pulmonary tissue in OVA-challenged rats, whereas neutrophil and mononuclear cell counts remained unchanged. In bone marrow, pre-exposure to SEA alone significantly increased the number of eosinophils, and that was further increased in OVA-challenged rats. Exposure to SEA post-OVA challenge did not affect the number of eosinophils, neutrophils and mononuclear cells in BAL fluid. Pre-exposure to the endotoxin lipopolysaccharide (LPS) in OVA-challenged animals rather enhanced the neutrophil number in BAL fluid. In rats pre-exposed to SEA and OVA-challenged, a marked elevation in the levels of TNF- α and eotaxin (but not of IL-10) in BAL fluid was observed. The eotaxin levels increased by about of 3-fold in alveolar macrophages treated with SEA in vitro. In conclusion, airways pre-exposure to SEA (but not the post-exposition) causes a selective increase in eosinophil number in BAL fluid, lung tissue and bone marrow of OVA-challenged rats by mechanisms involving enhancement of TNF- α and eotaxin synthesis.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Asma alérgica

A asma é uma doença mundial de prevalência progressiva responsável por grande parte dos gastos elevados em saúde pública (Wenzel *et al*, 1999; Douwes *et al*, 2002). Segundo a *Organização* Mundial de Saúde (OMS), cerca de 300 milhões de pessoas sofrem de asma, tendo sido registrados 255.000 casos de mortes devido à doença no ano de 2005 (Bloemen *et al.*, 2007). Esta doença é uma condição caracterizada por resposta inflamatória crônica das vias aéreas que resulta em broncoespasmo devido à liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios espasmogênicos provenientes de macrófagos alveolares, mastócitos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos (Wenzel *et al*, 1999; O'Byrne *et al.*, 1999; Busse e Lemanske, 2001). O desenvolvimento da asma envolve interações entre fatores externos (poluição, infecções virais, exposição a alérgenos), genéticos (histórico familiar de atopia) e estilo de vida (fumo, dieta e uso de antibióticos), e tem como características clínicas crises de dispnéia, tosse e sibilos. É uma doença episódica, alternando crises agudas com períodos assintomáticos (Vargaftig, 1999; Bloemen *et al.*, 2007).

A asma pode ser dividida em dois principais tipos: asma intrínseca e extrínseca. A asma intrínseca apresenta história negativa para alergia e níveis séricos normais de imunoglobulina E (IgE). Neste caso, os pacientes desenvolvem os sintomas típicos de asma (sibilo e dispnéia) após a exposição das vias aéreas a certos estímulos como infecções virais e/ou bacterianas, ar frio, inalantes irritantes (ex: dióxido de enxofre), drogas (ex: aspirina), estresse emocional e exercício físico (Miller, 2001; Tillie-Leblon *et al.*, 2005). A asma extrínseca é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade do tipo I, induzida por um antígeno extrínseco. Este tipo inclui a asma alérgica (atópica), ocupacional e aspergilose broncopulmonar alérgica (colonização brônquica com

Aspergillus, seguida pelo desenvolvimento de anticorpos IgE) (Miller, 2001; Tillie-Leblon *et al.*, 2005). A asma alérgica é a mais comum, sendo desencadeada por antígenos ambientais presentes na poeira, pólen, pêlos de animais, determinados alimentos, dentre outros. É frequentemente associada a histórico familiar de atopia. As crises agudas podem ser precedidas por manifestações de doenças alérgicas, como rinite, urticária ou eczema, reações cutâneas positivas à injeção intradérmica de extratos de antígenos inalados, níveis elevados de IgE no soro, e/ou respostas positivas a testes de provocação os quais envolvem a inalação de antígeno específico (Miller, 2001; Tillie-Leblon *et al.*, 2005).

A asma alérgica pode ser dividida em basicamente 3 fases: fase de indução da reação alérgica, fase imediata e fase tardia. Na fase de indução (ou sensibilização), o alérgeno inalado é englobado e processado por uma célula apresentadora de antígeno que estão distribuídas por todo o trato respiratório, desde a mucosa nasal até a pleura. Essas células migram para o linfonodo onde processam o alérgeno e o apresentam para linfócitos T. A ativação dos linfócitos T auxiliares do tipo 2 (TH₂) leva a produção de várias citocinas, sendo interleucina (IL) -4, -5, -9 e -13 as mais importantes para o desenvolvimento da asma. A IL-4 e -13 ativam os linfócitos B que por sua vez realizam o “switch” de classe de imunoglobulina passando a produzir e secretar IgE. Essas duas citocinas, junto com IL-9, são importantes para a ativação de mastócitos, o aumento na produção de muco e na hiperreatividade das vias aéreas. Uma vez sintetizada, IgE circula no sangue antes de se ligar ao seu receptor de alta afinidade FcεRI, presente na superfície de mastócitos e basófilos. Após a re-exposição ao alérgeno, o mesmo se liga a IgE específica que se encontra ligada ao seu receptor na membrana dos mastócitos; a ligação cruzada entre o antígeno e duas IgE adjacentes ativa vias de membrana e citosólicas que subsequentemente desencadeiam a secreção de mediadores pré-formados, como a histamina, estimula a síntese de prostaglandinas, cisteínil leucotrienos

e citocinas pelos mastócitos. Esses mediadores causam a denominada fase imediata da reação asmática que é caracterizada por contração das células musculares lisas das vias aéreas, extravasamento vascular, produção de muco, hiperreatividade das vias aéreas e recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e eosinófilos). Essa fase dura cerca de 30-60 minutos. Cerca de 4-6 horas após, a crise entra em sua fase tardia. Por sua vez, a fase tardia é caracterizada por inflamação excessiva das vias aéreas, resultando em mudanças estruturais que incluem espessamento da parede das vias aéreas, fibrose subepitelial, hiperplasia das células secretoras de muco, hiperplasia dos miofibroblastos, hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas e hipertrofia do epitélio. Esse processo de remodelamento que ocorre na fase tardia é resultante da ação de mediadores inflamatórios produzidos e secretados por células inflamatórias (eosinófilos, neutrófilos e linfócitos) e células estruturais (endotélio e epitélio pulmonar) ativadas. Dentre esses mediadores destacam-se as metaloproteínases (principalmente MMP-9), citocinas (IL-9 e, principalmente, o fator transformador de crescimento β (TGF- β), quimiocinas (CCL2, CCL7 e CCL22) e mediadores lipídicos (cisteínil leucotrienos; prostaglandinas D2 e E2) (Ying *et al.*, 2006; Bloemen *et al.*, 2007).

Várias espécies animais têm sido usadas como modelos de asma, incluindo cobaias, cães, camundongos e ratos (Petrolani *et al.*, 1988; Gaspar-Elsas *et al.*, 1997; O'byrne *et al.*, 1999; Lintomen *et al.* 2002; Medeiros *et al.*, 2001, 2003). Entretanto, a complexidade da doença humana não tem sido totalmente reproduzida em animais, existindo apenas modelos de inflamação alérgica que reproduzem algumas características da doença, como broncoconstrição, hipersecreção de muco e inflamação crônica com infiltração de leucócitos (Vargaftig, 1999). O procedimento experimental mais frequentemente utilizado é a indução de um estado alérgico, que é caracterizado por uma hipersensibilidade do tipo imediata ou anafilática a um antígeno conhecido. Isto pode ser

obtido através da sensibilização à ovalbumina, normalmente associada ao hidróxido de alumínio, que resulta em imunidade mediada por células e formação de anticorpos (principalmente a IgE), dependente de células T (no caso, células TH₂). Após 14 dias da sensibilização, a resposta inflamatória alérgica pode ser observada nos animais após a provocação intranasal ou intratraqueal com o alérgeno (Petrolani *et al.*, 1988; Renz *et al.*, 1992; Kung *et al.*, 1994; Egan *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2004).

1.2. Asma e eosinófilos

Dados obtidos de pacientes asmáticos e de modelos experimentais de asma mostram que os eosinófilos desempenham papel importante nesta doença. O acúmulo seletivo e a ativação destas células na mucosa brônquica são considerados eventos centrais na patogênese desta doença (Shahabuddin *et al.*, 2000). Pacientes asmáticos apresentam número elevado de eosinófilos no sangue e no LBA, e infiltrado inflamatório pulmonar rico em células ativadas, como mastócitos, monócitos, linfócitos e, principalmente, eosinófilos (Sato *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2001). A importância dos eosinófilos na asma tem sido enfatizada pelos achados que correlacionam o grau de eosinofilia no sangue (e no LBA) com o grau de hiperreatividade brônquica e a gravidade da doença (Gonzalo *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1999; Ying *et al.*, 2006).

Os eosinófilos correspondem a 2% dos leucócitos presentes no sangue humano. Possuem, em geral, núcleo bilobado com cromatina altamente condensada e citoplasma contendo dois tipos principais de grânulos, o específico (ou secundário) e o primário. O grânulo específico tem uma aparência ultraestrutural distinta contendo basicamente duas regiões, uma região eletrôn-densa que contém proteína básica principal (MBP) -1 e -2 e é denominada de cristal central; a outra região, denominada de matriz, contém as proteínas tóxicas (proteína catiônica do eosinófilo (ECP), peroxidase do eosinófilo (EPO) e

neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN). Os grânulos primários são similares àqueles encontrados em outros tipos de granulócitos e são formados na fase inicial do desenvolvimento de eosinófilos. Os eosinófilos também contêm corpos lipídicos que são importantes para a síntese de eicosanóides. O retículo endoplasmático, as mitocôndrias e o aparelho de Golgi são pouco desenvolvidos nestas células (Junqueira e Carneiro, 1999; Giembycz e Lindsay, 1999; Prussin e Metcalfe, 2006). Esses granulócitos expressam várias moléculas de superfície, incluindo receptores para IL-3, IL-5 e para GM-CSF; receptores para quimiocinas (CCR1 e CCR3); FcγRII (CD32- receptor para IgG); FcαRI (receptor para IgA secretória); receptores para fatores do sistema complemento (C3aR, CD88 e CD35) e moléculas de adesão (VLA-4 e integrina $\alpha_4\beta_7$). Exibe ainda uma mínima expressão intracitoplasmática de FcεRI cuja significância funcional ainda não é clara (Prussin e Metcalfe, 2006).

A eosinopoiese ocorre na medula óssea onde os eosinófilos se diferenciam a partir de células progenitoras hematopoiéticas que possuem em sua superfície a molécula CD34, uma glicoproteína específica de precursores hematopoiéticos, sendo, portanto denominadas de células CD34⁺ (Gleich, 2000; Rothenberg e Hogan, 2006; HOGAN *et al.*, 2008). A diferenciação dessas células precursoras pluripotentes em eosinófilos é regulada por, pelo menos, 3 fatores de transcrição, incluindo GATA-1, PU.1 e C/EBP. Dentre esses fatores de transcrição, GATA-1 certamente é o mais importante para o desenvolvimento da linhagem eosinofílica uma vez que a deleção da região de alta afinidade para GATA-1 resulta em completa perda da linhagem eosinofílica (Humbles *et al.*, 2004; Rothenberg e Hogan, 2006; Hogan *et al.*, 2008). Três citocinas, no caso IL-3, IL-5 e GM-CSF, são particularmente importantes na regulação do desenvolvimento dessas células possivelmente por fornecer sinais que permitem a proliferação e a diferenciação celular (Holt *et al.*, 1999). Dentre as três, IL-5

é a citocina que seletivamente regula o processo de diferenciação dos eosinófilos, atuando principalmente nos últimos estágios de maturação e ativação dessas células, podendo também prolongar a sobrevivência das mesmas. Além disso, IL-5 estimula a liberação dos eosinófilos da medula óssea para a circulação sanguínea, atuando, portanto, como um estímulo quimiotático (Chung e Barnes, 1999; Gleich, 2000; Rothenberg e Hogan, 2006; Rosenberg *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2008). Esses efeitos da IL-5 se devem a ligação dessa citocina em seu receptor IL-5R, cuja expressão é restrita aos eosinófilos e seus precursores imediatos (Chung e Barnes, 1999; Rosenberg *et al.*, 2007).

Eosinófilos maduros saem da medula óssea para a circulação sanguínea e são recrutados para os sítios de inflamação alérgica pela ação de fatores pró-inflamatórios produzidos por células endoteliais e epiteliais ativadas em resposta ao estímulo alérgico (Rosenberg *et al.*, 2007). O recrutamento de eosinófilos para o tecido inflamado é complexo, sendo regulado por vários fatores, incluindo a IL-4, IL-5 e IL-13, eotaxinas, RANTES, MIP-1 α , NO e moléculas de adesão (integrinas β 1, β 2 e β 7) (Gonlugur e Efeoglu, 2004; Rothenberg e Hogan, 2006; Rosenberg *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2008). Entre esses fatores, somente a IL-5 e as eotaxinas seletivamente regulam o influxo de eosinófilos para o foco de inflamação, havendo uma cooperação entre ambas na promoção de eosinofilia tecidual (Rankin *et al.*, 2000). Eotaxinas promovem a migração de eosinófilos pela estimulação do receptor CCR3 que está acoplado a proteína G do tipo Gi- α . A ligação da eotaxina em seu receptor desencadeia uma série de eventos incluindo mobilização de cálcio, “*upregulation*” de CD11b, ativação da proteína MAP-kinase e ERK2, produção de radicais livres de oxigênio, polimerização de actina e rápida alteração na forma celular que está associada com a quimiotaxia e a secreção de grânulos (Conroy e Williams, 2001; Pease e Williams, 2001).

A migração de eosinófilos para o foco inflamatório envolve o contato inicial destas células com a parede do vaso sanguíneo, antes do extravasamento, sendo esta etapa mediada pelas selectinas (E, L e P-selectinas). A expressão de E- e P-selectinas nas células endoteliais pode aumentar na presença de IL-1 e TNF- α , enquanto a L-selectina é constitutivamente expressa nos eosinófilos, e se liga ao MAdCAM-1 endotelial e CD34 (Gonlugur e Efeoglu, 2004). A adesão firme dos eosinófilos se faz pela interação das integrinas com os seus ligantes. As moléculas mais importantes para a adesão firme de eosinófilos ao endotélio são Mac-1 (CD11b/CD18; $\alpha_x\beta_2$) e VLA-4 (CD49d/CD29; $\alpha_4\beta_1$), que se ligam ao ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e VCAM-1 (molécula de adesão da célula vascular-1), ambos membros da superfamília das imunoglobulinas, e responsáveis pela interação célula-célula presentes na superfície das células endoteliais (Gonlugur e Efeoglu, 2004; Lampinen *et al.*, 2004). Estas integrinas também podem se ligar a componentes da matriz extracelular, como a fibronectina e o fibrinogênio (Zhang e Plow, 1996; Conran *et al.*, 2001). Em resumo, uma variedade de mediadores inflamatórios em contato com a superfície das células endoteliais é reconhecida pelos eosinófilos. Isto leva à ativação das integrinas presentes nos eosinófilos, que resulta numa adesão estável (firme), possibilitando a migração trans-endotelial.

Uma vez no tecido inflamado, os eosinófilos tornam-se ativados e liberam substâncias citotóxicas, como radicais livres de oxigênio e proteínas granulares tóxicas (MBP, ECP e EPO), bem como sintetizam e liberam mediadores inflamatórios, incluindo IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-16, TGF- β , RANTES, eotaxina, mediadores lipídicos (PAF e LTC₄) os quais podem intensificar a resposta inflamatória (Giembycz e Lindsay, 1999; Foster, 1999; Gleich, 2000; Powell *et al.*, 2001; Rothenberg e Hogan, 2006; Hogan *et al.*, 2008). A liberação das proteínas granulares tóxicas se dá pelo processo denominado

de desgranulação, podendo esta ocorrer via três mecanismos: exocitose clássica (grânulo secundário se funde diretamente com a membrana plasmática liberando completamente o conteúdo granular para o meio extracelular), desgranulação gradativa (pequenas vesículas se formam a partir do grânulo secundário e transportam pequenas quantidades de proteínas granulares para a superfície celular, resultando em perda progressiva do conteúdo granular) e citólise (processo de morte celular altamente organizado em que a membrana celular perde sua integridade resultando e secreção do conteúdo granular). O conteúdo granular acarreta danos ao epitélio das vias aéreas e à matriz extracelular, bem como exposição de terminações nervosas que gera hiperreatividade das vias aéreas, contração das células musculares lisas das vias aéreas e aumento da permeabilidade vascular (Clark *et al.*, 2004; Kay e Klion, 2004).

1.3. Asma e fatores de exacerbação

A asma é uma doença alérgica que resulta da complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Embora não existam dúvidas quanto à questão de existirem regiões no genoma suscetíveis a polimorfismos múltiplos, fator que predispõe geneticamente o indivíduo a desenvolver a doença, o ambiente também desempenha um papel crucial no desenvolvimento da mesma, pois é quem determina o início da manifestação patológica, contribui na manutenção e para com a gravidade da doença alérgica (Renz e Herz, 2002; Lemanske e Busse, 2006). A contribuição do ambiente é salientada pela crescente prevalência da asma principalmente em países desenvolvidos. Esse aumento não pode ser explicado isoladamente pelo componente genético uma vez que a taxa de mutação “natural” é baixa e alterações substanciais no genoma não ocorrem em poucas gerações. Portanto, pesquisas recentes têm focado na identificação e

isolamento de fatores ambientais que contribuam para esse fenômeno (Renz e Herz, 2002).

Os fatores ambientais responsáveis pela exacerbação da asma incluem exposição à alérgenos (ácaros, baratas, *Alternaria sp* e gatos) em indivíduos imunizados, infecções virais (rinovírus principalmente) e bacterianas (*Chlamydia sp*, *Mycoplasma sp*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*), exercícios físicos, antiinflamatórios não-estereodais (aspirina), refluxo gastroesofágico e estresse (Lemanske e Busse, 2006; Bisgaard *et al.*, 2007). Esses fatores podem contribuir para os quadros de exacerbação da asma atuando isoladamente ou interagindo entre si (Lemanske e Busse, 2006). Por exemplo, estudos realizados em humanos e camundongos sugerem que a interação entre infecções virais e exposição à alérgenos em indivíduos asmáticos contribui para gravidade da doença, aumentando a inflamação alérgica das vias aéreas (Murray *et al.*, 2004; Bartlett *et al.*, 2008). Outros trabalhos sugerem que a colonização das vias aéreas pelo *S. aureus* e a liberação de suas enterotoxinas podem exacerbar doenças respiratórias alérgicas, bem como aumentar o risco de manifestação das mesmas (Bachert *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Bachert, 2008). Entretanto, as infecções respiratórias exercem papel ambíguo na fisiopatologia da asma uma vez que podem exercer tanto um papel preventivo quanto potencializador (Eiserbarth *et al.*, 2002). Por exemplo, evidências sugerem que a exposição contínua ao LPS, um componente da parede de bactérias gram-negativas, em fases iniciais da vida, exerce efeito preventivo em doenças alérgicas, incluindo a asma. Em contraste, a exposição ao LPS em fases tardias da vida, ou seja, quando a sensibilização ao alérgeno já ocorreu, pode promover ou exacerbar a resposta inflamatória. Esses resultados experimentais explicariam a observação clínica de exacerbação da asma durante uma infecção bacteriana ou viral (Silva *et al.*, 2000; Renz e Herz, 2002).

1.4. *Staphylococcus aureus* e enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) pertencem a uma família de proteínas neurotóxicas produzidas e excretadas por algumas cepas da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). *S. aureus* é freqüentemente encontrado como parte da microflora da pele, trato respiratório e gastrointestinal de humanos. Aproximadamente 25% da população é hospedeira permanente dessa bactéria que, na maioria dos casos, não gera doença. Entretanto, alguns fatores tornam o hospedeiro suscetível às infecções causadas por *S. aureus*. Estes fatores incluem lesões na pele e mucosas, função leucocitária anormal, infecções virais (influenza, por exemplo), distúrbios metabólicos (diabete mellitus), intervenções hospitalares e condições mistas (má nutrição, idade) (Bachert *et al.*, 2002).

As SEs são proteínas básicas com peso molecular variando entre 25.000 - 30.000 Da, estáveis em meio ácido, resistentes ao aquecimento e à digestão por enzimas proteolíticas. Estruturalmente, são semelhantes entre si, e por critérios imunológicos foram classificadas em tipos diferentes, designados alfabeticamente de A a E e de G a Q (Bergdoll, 1989; Iandolo, 1989; Munson, *et al.*, 1998; Baladan e Rasooly, 2000; Orwin *et al.*, 2001). Recentemente, foram descritos os genes que codificam as enterotoxinas dos tipos S e T (Ono *et al.*, 2008). Entre as SEs, as toxinas do tipo A e B podem ser facilmente purificadas e obtidas em grandes quantidades, e, portanto, são extensivamente empregadas em investigações experimentais (Bergdoll *et al.*, 1974).

Essas toxinas atuam como “superantígenos” (Bobak e Guerrant, 1992) e acredita-se que parte de suas ações deva-se a este efeito imunomodulador que inclui alta afinidade com moléculas do complexo de histocompatibilidade classe II (MHC –class II) e indução da proliferação de linfócitos T ($CD4^+$, $CD8^+$ e gama δ^+) (Bachert *et al.*, 2002; Proft e Fraser, 2003). Os superantígenos são moléculas que se ligam ao MHC–

classe II fora do sítio de ligação de peptídeos convencionais, sendo a ligação cruzada com o TCR uma interação com a face externa da cadeia V β do mesmo, estimulando linfócitos T a secretarem uma grande quantidade de citocinas inflamatórias (Zamoyska, 2006). Assim, a suscetibilidade dos linfócitos T aos superantígenos é dependente da cadeia β específica que leva a abundante ativação dessas células, sendo a reação imune ao superantígeno uma resposta multiclonal (Neumann *et al.*, 1997; Bachert *et al.*, 2008). Na asma alérgica, os linfócitos TH₂ regulam a inflamação brônquica via secreção de IL-4, IL-5 e IL-13, estando cada uma destas citocinas relacionada com uma determinada característica da asma alérgica, tais como produção de IgE, eosinopoiese, geração de eosinofilia brônquica, hipersecreção de muco e hiperreatividade brônquica (Busse e Lemanske, 2001). Alternativamente, células TH₂ podem ser ativadas por superantígenos via ligação da cadeia β do TCR ao MHC–class II na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC) (Li *et al.*, 1999).

Várias disfunções podem ser ocasionadas pelas SEs e as mesmas podem resultar da liberação de vários mediadores inflamatórios como citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, INF- γ e TNF- α), aminas derivadas de mastócitos (histamina e 5-hydroxytryptamine), neuropeptídeos (substância P), mediadores lipídicos (PGE₂ e PAF), NO, entre outros (Marrack e Kappler, 1990; Micusan e Thibodeau, 1993; Desouza *et al.*, 1998; Tessier, *et al.*, 1998; Linardi *et al.*, 2000; Franco-Penteado *et al.*, 2001; Desouza *et al.*, 2001). A maioria das intoxicações alimentares em humanos deve-se às SEs (Müller-Alouf *et al.*, 2001). Embora o(s) mecanismo(s) de ação *in vivo* destas toxinas ainda não tenham sido claramente elucidados (Bergdoll e Chesney, 1991; Bobak e Guerrant, 1992; Micusan e Thibodeau, 1993), as manifestações enteropatológicas destas toxinas parece envolver a estimulação de neurônios do trato gastrointestinal, macrófagos e linfócitos (Micusan e Thibodeau, 1993). Em humanos, vários estudos mostraram que os efeitos

fisiopatológicos das SEs e de outras toxinas bacterianas envolvem a liberação de prostaglandinas, histamina, serotonina, leucotrienos, citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ) e NO, produzidos por células como os mastócitos, macrófagos e linfócitos (Dinarello, 1991; Kluger, 1991; Cunha *et al.*, 1992; Micusan e Thibodeau, 1993; Ferreira, 1993; Haskó *et al.*, 1998; Won *et al.*, 2000).

A administração sistêmica da SEB em camundongos induz a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios incluindo o TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 e o NO (Miethke *et al.*, 1992; Gonzalo *et al.*, 1994; Florquim *et al.*, 1994; Haskó *et al.* 1998). O NO parece exercer efeito protetor contra o choque tóxico induzido por estas toxinas em camundongos, visto que a administração prévia de L-NAME potencializa o choque letal produzido por estas toxinas (Florquim *et al.*, 1994).

Em relação à estimulação de neurônios sensoriais pelas SEs, sugere-se que SEA e SEB induzem em camundongos inflamação do tipo neurogênica. Nestes animais, o tratamento com capsaicina (substância capaz de depletar as fibras C sensoriais do seu conteúdo de neuropeptídeos) é capaz de reduzir a infiltração peritoneal de neutrófilos causada por estas SEs (Desouza *et al.*, 1996; Desouza e Ribeiro-Dasilva, 1996, 1997, 1998). O edema inflamatório induzido pela SEB em camundongos envolve a formação local de cininas, ativação direta de receptores vanilóides em neurônios sensoriais e desgranulação de mastócitos (Linardi *et al.*, 2000).

A migração peritoneal de neutrófilos induzida por SEA ou SEB é modulada, em parte, por macrófagos residentes (Desouza e Ribeiro-Dasilva, 1996, 1997). Além disto, demonstrou-se que macrófagos de camundongos estimulados *in vitro* com SEA ou SEB liberam componentes protéicos com atividade quimiotática *in vivo* e *in vitro* para neutrófilos (Desouza *et al.*, 2001; Desouza *et al.*, 2002).

Quanto à contribuição dessas toxinas para o desenvolvimento de inflamação na pele, sugere-se que a colonização desse tecido por *S. aureus* pode contribuir na exacerbação da dermatite atópica. Laouini *et al.* (2003) mostraram, em seus protocolos experimentais, que camundongos quando submetidos à administração epicutânea de SEB, desenvolviam um quadro de inflamação alérgica na pele caracterizado por influxo de linfócitos TH₂ e elevados níveis de IgE.

1.5. Resposta inflamatória pulmonar produzida por enterotoxinas estafilocócicas

Estudos conduzidos com humanos apontam que pacientes com asma brônquica expostos a SEA/SEB apresentam altos níveis de IgE específicos para SEs e, conseqüentemente, altos níveis séricos de IgE total, fenômeno que está intimamente relacionado com o quadro de hiperreatividade brônquica entre outros sintomas da asma, sugerindo que SEA/SEB podem exacerbar doenças respiratórias alérgicas, bem como aumentar o risco de manifestação das mesmas (Bachert *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). São crescentes as evidências de que as SEs amplificam a inflamação eosinofílica em pacientes que sofrem de rinosinusites com formação de polipoides nasais, ocorrendo isso por várias vias tais como aumento na liberação de citocinas TH₂, formação de IgE e a regulação negativa da produção de citocinas por células T regulatórias. Dessa forma, as SEs contribuiriam para a gravidade bem como para a cronicidade de processos inflamatórios alérgicos (Bachert *et al.*, 2008). Entretanto, os mecanismos pelos quais as SEs exacerbam a inflamação pulmonar em indivíduos asmáticos expostos a essas enterotoxinas não foram elucidados.

Na tentativa de esclarecer esses mecanismos, alguns estudos utilizando modelos animais têm sido desenvolvidos. Neumann *et al.* (1997) mostraram que camundongos submetidos à administração sistêmica de SEB desenvolveram inflamação pulmonar

caracterizada por infiltração de leucócitos, danos no endotélio e aumento de permeabilidade vascular. Além disto, uma resposta inflamatória pulmonar caracterizada por influxo de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos também foi observada após a administração intranasal de SEB em camundongos (Herz *et al.*, 1999).

Resultados recentes obtidos em nosso laboratório mostraram que a administração intratraqueal de SEA em ratos induz resposta inflamatória pulmonar caracterizada por influxo maciço de neutrófilos, cuja resposta máxima é observada 4 h após a administração de SEA (Desouza *et al.*, 2005). Por outro lado, a SEA e a SEB são incapazes de induzir quimiotaxia ou adesão de neutrófilos *in vitro*. A resposta inflamatória pulmonar induzida pela SEA (e SEB) envolve participação da ciclooxigenase-2, da lipoxigenase e do NO. Estes resultados foram confirmados pelo aumento de expressão de RNAm para COX-2 e para iNOS observado em tecido pulmonar de ratos expostos à SEA, e pelo efeito protetor do pré-tratamento com antagonistas específicos para COX-2 e iNOS, além dos níveis aumentados de PGE₂ e LTB₄ no LBA (Desouza *et al.*, 2005; 2006). Além destes mediadores, os níveis de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-10 também se elevam no LBA de ratos submetidos à exposição aérea com SEA ou SEB.

Em trabalho recente, Hellings *et al.* (2006) demonstraram que camundongos submetidos à administração nasal ou brônquica de SEB apresentam várias características da asma humana grave como eosinofilia brônquica, aumento nos níveis de citocinas TH₂, aumento na expressão de RNAm para IL -12 p40, IFN γ , TGF β , bem como elevada produção de IgE.

1.6. Objetivo

O principal objetivo deste trabalho é investigar os efeitos da exposição a SEA sobre a resposta inflamatória pulmonar alérgica em ratos, procurando investigar os mecanismos responsáveis por seus efeitos.

1.7. Estratégias experimentais

- Avaliar a cinética do influxo celular para o LBA de ratos sensibilizados e submetidos ao desafio antigênico com OVA;
- Quantificar os níveis de IgE no soro de ratos sensibilizados e submetidos ao desafio antigênico com OVA;
- Investigar o efeito da exposição das vias aéreas de ratos sensibilizados à SEA e submetidos ao desafio antigênico com OVA;
- Realizar a análise histológica de cortes de pulmões de ratos submetidos à pré-exposição com SEA;
- Quantificar os níveis de eotaxina, TNF- α e IL-10 no LBA de ratos pré-expostos à SEA e submetidos ao desafio antigênico com OVA em animais sensibilizados;
- Quantificar os níveis de eotaxina no sobrenadante de macrófagos alveolares isolados de ratos naïve, cultivados na presença e na ausência de SEA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 200-250 g, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Unicamp). Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia (Faculdade de Ciências Médicas), pelo menos 24 h antes dos experimentos, onde foram mantidos a 24°C, com iluminação diária de 12 h e com água e alimentação *ad libitum*. Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP, protocolo nº 1056-1.

2.2. Sensibilização e desafio dos animais com ovalbumina (OVA)

Os animais foram sensibilizados através da injeção subcutânea no dorso (0.15 ml) de uma solução contendo 12 mg de ovalbumina (OVA-grau III, Sigma) adsorvida em 8 mg de hidróxido de alumínio, preparada em solução fisiológica. Animais não sensibilizados receberam injeção somente de hidróxido de alumínio. Quatorze dias após, os animais sensibilizados e não sensibilizados foram submetidos a instilação intranasal de OVA (0,2 mL de solução de OVA contendo 5 mg/mL) ou salina fosfatada (PBS; 0,2 mL) para os controles.

2.3. Protocolos experimentais

2.3.1. Pré-exposição à SEA

Quatorze dias após a sensibilização com OVA, os animais foram submetidos à instilação intranasal com 0,2 mL de solução de SEA nas doses de 1 e 3 ng, enquanto que o grupo controle foi instilado com PBS (0,2 mL). Quatro horas após a instilação

com SEA (ou PBS) os animais foram desafiados (instilação intranasal) com OVA (0,2 mL de solução de OVA contendo 5 mg/ mL), sendo o LBA recolhido 24 h após o desafio com OVA.

2.3.2. Pós-exposição à SEA

Neste protocolo experimental, ratos sensibilizados com OVA foram, 14 dias depois, submetidos ao desafio antigênico com OVA e, quatro horas após, sofreram a instilação intranasal de SEA (3 ng/rato em 0,2 mL de PBS). Os animais controles receberam a instilação intranasal de 0,2 mL de PBS ao invés de OVA. O LBA foi realizado 24 horas após a instilação de SEA.

2.3.3 Pré-exposição ao LPS

Para avaliar se produtos de bactérias gram-negativas são capazes de exacerbar a resposta inflamatória pulmonar alérgica induzida por OVA, as vias aéreas de ratos sensibilizados foram submetidas à instilação de LPS (proveniente de *Salmonella abortus equi*) nas doses de 0,1 e 1 µg/rato, contidas em 0,2 mL de PBS. Os animais controles receberam 0,2 mL de PBS intranasal somente. O desafio antigênico foi realizado 4 horas após a instilação intranasal de LPS, e o LBA obtido 24 h após o desafio com OVA.

2.4. Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA) e contagem de leucócitos

O LBA foi obtido 12, 24 e 48 h após o desafio com OVA. Para tanto, os animais foram anestesiados e exsanguinados via secção da aorta abdominal. A região do pescoço foi aberta e a traquéia canulada com auxílio de um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro). O LBA foi realizado com 25 ml de tampão PBS contendo 20 UI/mL de

heparina, à temperatura ambiente. O PBS injetado foi cuidadosamente aspirado em 4 alíquotas, sendo a primeira de 10 ml e as três seguintes de 5 ml. O material recolhido foi centrifugado a 400 g, por 10 min à 20°C e o resíduo celular ressuspensão em PBS. A contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de leucócitos realizada em lâminas confeccionadas em citocentrífuga e coradas com corante Diff Quick. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina, foram contadas 200 células, diferenciando 5 tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos) e mastócitos. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos foram expressos como número de célula por mL de lavado broncoalveolar.

2.5. Coleta de sangue e plasma

Conforme citado acima, antes da realização do LBA, os animais foram mortos através da exsanguinação via aorta abdominal, sendo o sangue coletado na presença de heparina (20 UI/mL). O mesmo foi utilizado para confecção de lâminas para realização de contagens totais e diferenciais de leucócitos. A contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de leucócitos realizada em lâminas confeccionadas através da técnica de esfregão e coradas a seguir com corante Diff Quick. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina foram contadas 100 células, diferenciando-se os neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células. Os resultados das contagens total e diferencial dos

leucócitos foram expressos como número de célula por mL de sangue. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 400 g, por 10 min à 20°C, sendo o plasma coletado e estocado à -80°C para dosagens de mediadores inflamatórios.

2.6. Contagem de leucócitos na medula óssea

O fêmur direito de ratos sensibilizados e pré-expostos à SEA (3 ng/ 0,2 mL de PBS) ou PBS (grupo controle) foi removido 24 horas após o desafio com OVA. No caso dos animais submetidos ao protocolo de pós-exposição à SEA, o lavado medular foi obtido 24 h após a instilação intranasal de SEA.

Para a obtenção do lavado medular, a epífise e a diáfase de fêmures livres de tecidos moles foram transversalmente cortadas; em seguida, a medula óssea foi removida pela lavagem com 5 mL PBS contendo heparina (20 UI/ mL). Esse lavado foi então centrifugado a 400 g, por 10 min à 20°C, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 2 mL de PBS heparinizado (20 UI/ mL). Em seguida, realizou-se a contagem total e diferencial dos leucócitos medulares.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em lâminas confeccionadas em citocentrífuga e coradas a seguir com corante Diff Quick. A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina, foram contadas 200 células, diferenciando os seguintes tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos, enquanto que linfócitos e monócitos foram classificados como “outras células”. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos foram expressos como número de célula por fêmur.

2.7. Análise morfológica de pulmões de ratos sensibilizados e pré-expostos à SEA

Animais pré-expostos à SEA foram 24 h após o desafio antigênico com OVA anestesiados com halotano e sacrificados por exsanguinação via aorta abdominal. Em seguida, a caixa torácica foi aberta por meio de uma incisão em forma de Y. Com os pulmões *in situ*, a traquéia foi canulada e perfundida com formalina (10 %) sobre pressão constante de 20 cmH₂O até que os pulmões fossem completamente inflados. A traquéia foi suturada e os pulmões e o coração removidos em bloco. Esses órgãos ficaram imersos em formalina (10%) por 24 h para que fossem fixados. Posteriormente, esses pulmões foram examinados macroscopicamente e seccionados transversalmente em segmentos de aproximadamente 3 mm. Somente a região que compreende o terço médio do aspecto caudal de ambos os pulmões foi embebida em parafina. Essas porções foram seccionadas, tendo os cortes espessura entre 4 e 5 µm os quais foram corados com hematoxilina-eosina (H-E). O infiltrado peribronquilar foi avaliado em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200 adaptado à câmera Nikon Coolpix 995 camera (3Mpixel)) sob objetiva de 40X de aumento. Para cada animal, as contagens de leucócitos totais e diferenciais foram realizadas em 3 campos de grande aumento com o auxílio do software Imagelab Analysis (versão 2.4).

2.8. Quantificação dos níveis de IgE, eotaxina, TNF- α e IL-10 no soro e no LBA

Amostras de LBA e soro de animais sensibilizados com OVA, pré-expostos à SEA e em seguida submetidos ao desafio antigênico, foram armazenadas em freezer à -80° C para dosagem desses mediadores inflamatórios. Kits comerciais foram utilizados para os ensaios de quantificação dos níveis séricos de IgE (Shibayagi Co. Ltd., Japão), enquanto que os níveis de eotaxina (R&D Systems, EUA), TNF- α (R&D Systems,

EUA) e IL-10 (R&D Systems, EUA) foram quantificados no LBA. A leitura da placas foi realizada em leitor de ELISA (SpectrMAX), em comprimento de onda apropriado.

2.9. Estimulação com SEA de macrófagos alveolares isolados de ratos naïve e cultivados in vitro

O LBA de ratos naïve foi coletado e processado para a realização de contagem total de células. As células foram então ressuspensas em solução de Krebs e os macrófagos isolados pela técnica de adesão dessas células em placas plásticas de cultura de tecido com 6 poços. Cada poço recebeu 1 mL de solução de células contendo 2×10^6 macrófagos que foram colocados para aderir a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO₂. Após 2 h, as células não aderentes foram removidas por 3 lavagens seguidas com PBS. A população aderente foi então incubada por 2 h com 1 mL de Krebs (controle) ou SEA (10 µg/ml). Subsequentemente, o sobrenadante foi recolhido e estocado à – 80 °C para posterior quantificação dos níveis de eotaxina.

2.10. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M.). Diferenças estatísticas foram determinadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas, usando um pacote de programa para análises estatísticas (GraphPhad software, versão 3,0; San Diego, USA). Os resultados obtidos na análise morfológica do tecido pulmonar foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M.), enquanto que as diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do desafio antigênico com OVA sobre o número de leucócitos obtidos no LBA de ratos sensibilizados e não sensibilizados

Em ratos não sensibilizados e submetidos à instilação intranasal com OVA (24 h), notamos que os leucócitos consistiam essencialmente de células mononucleares (89,5%), acompanhadas de discreto número de neutrófilos (aproximadamente 10%), enquanto que os eosinófilos estavam praticamente ausentes ($0,01 \pm 0,01 \times 10^6/\text{mL}$) quando comparados com grupo de animais não sensibilizados e instilados com PBS (Tabela 1).

A tabela 1 mostra também que a instilação de OVA em animais previamente sensibilizados causou marcante influxo de eosinófilos para o LBA conforme avaliado em 12, 24 e 48 h após o desafio antigênico, quando comparado aos correspondentes grupos sensibilizados e instilados com PBS. O influxo máximo de eosinófilos foi obtido no LBA em 24 h. Notamos também aumento significativo no número de neutrófilos nos LBA nos tempos de 12 e 24 h após desafio antigênico, quando comparado aos animais instilados com PBS. O número de células mononucleares não alterou no LBA em 12 e 24 h; entretanto, um aumento significativo foi observado em 48 h após desafio com OVA (Tabela 1). Uma vez que o pico de influxo eosinofílico no LBA se deu em 24 h após o desafio antigênico com OVA, adotamos esse tempo para a realização dos demais protocolos experimentais.

Esse pico de influxo eosinofílico no LBA (24 h) foi acompanhado por elevação significativa dos níveis de IgE quantificados em amostras de soro de ratos sensibilizados e instilados com OVA em comparação ao respectivo grupo controle (PBS+OVA não sensibilizados: $75,0 \pm 5,3$ ng/mL de soro; PBS+OVA sensibilizados: $265,1 \pm 77,5 \times 10^6$ ng/mL de soro; $P < 0,05$).

Tabela 1. Número de leucócitos encontrados no lavado broncoalveolar (LBA) de ratos sensibilizados obtido 12, 24 e 48 h após desafio antigênico com ovalbumina (OVA).

Número de células $\times 10^6/\text{MI}$				
Não sensibilizados				
	TOTAL	Neutrófilos	Eosinófilos	Mononucleares
PBS+PBS (24 h)	4,45 $\pm$ 0,19	0,15 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,01	4,28 $\pm$ 0,54
PBS+OVA (24 h)	5,15 $\pm$ 0,88	0,53 $\pm$ 0,12*	0,01 $\pm$ 0,01	4,61 $\pm$ 0,65
Sensibilizados				
PBS+PBS (12h)	2,25 $\pm$ 0,34	0,05 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	2,19 $\pm$ 0,33
PBS+OVA (12 h)	3,72 $\pm$ 0,08*	0,51 $\pm$ 0,13*	0,23 $\pm$ 0,06*	2,97 $\pm$ 0,19
PBS+PBS (24 h)	3,14 $\pm$ 0,19	0,11 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,01	3,01 $\pm$ 0,19
PBS+OVA(24 h)	6,07 $\pm$ 0,74*	1,96 $\pm$ 0,56*	0,61 $\pm$ 0,11*	3,49 $\pm$ 0,47
PBS+PBS (48 h)	1,62 $\pm$ 0,06	0,04 $\pm$ 0,02	0,00 $\pm$ 0,00	1,58 $\pm$ 0,04
PBS+OVA (48 h)	2,57 $\pm$ 0,12*	0,05 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,07*	2,20 $\pm$ 0,25*

A contagem de leucócitos foi realizada no LBA em 12, 24 e 48 h após a instilação intranasal de OVA (1 mg/0,2 mL de PBS) ou PBS (0,2 mL) no caso de grupos controle.

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. provenientes de 7 animais por grupo. * P < 0,05 comparado ao correspondente grupo PBS.

3.2. Efeito da pré-exposição das vias aéreas à SEA sobre o número de leucócitos no LBA

A figura 1 mostra que a instilação intranasal de SEA, na dose de 3 ng, ocasionou um aumento significativo (56%) no número de eosinófilos no LBA de animais desafiados com OVA em 24 horas, quando comparado aos animais pré-expostos ao PBS (grupo PBS+OVA). O número de neutrófilos não foi significativamente alterado no LBA de ratos previamente expostos à SEA e desafiados com OVA (Tabela 2). Em animais submetidos à pré-exposição com 1 ng de SEA e em seguida desafiados com OVA, notamos elevação significativa de células mononucleares, que não foi observado com a dose maior de SEA (3 ng; Tabela 2). Visto que a potencialização do influxo eosinofílico foi observado com a dose de 3 ng de SEA, adotamos essa dose da enterotoxina para a realização dos demais protocolos experimentais.

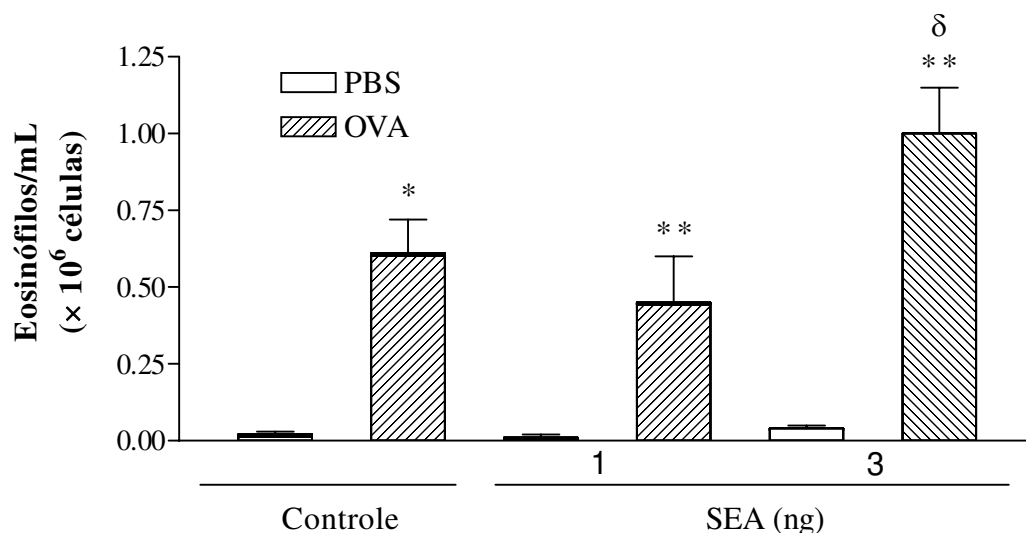


FIGURA 1. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (1 e 3 ng) no influxo de eosinófilos para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pela ovalbumina (OVA) em 24 h. Animais sensibilizados foram no 14^o dia submetidos à instilação intranasal de SEA (1 ou 3 ng/0,2 mL de PBS) ou PBS (animais controles), e 4 h após receberam OVA (0,2 mL de solução de OVA contendo 5 mg/mL) também pela via intranasal. O LBA foi obtido 24 h após o desafio antigênico com OVA. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. provenientes de 5 – 7 animais por grupo. *P < 0,05 e **P < 0,05 comparado ao respectivo grupo PBS; δ P < 0,05 comparado ao grupo OVA previamente instilado com PBS.

Tabela 2. Número de neutrófilos e células mononucleares encontrados no lavado broncoalveolar (LBA) de ratos pré-expostos à SEA (1 e 3 ng) obtido 24 h após desafio antigênico com ovalbumina (OVA).

Número de células $\times 10^6/\text{mL}$		
	Neutrófilos	Mononucleares
PBS+PBS	0,12 $\pm$ 0,02	3,18 $\pm$ 0,40
PBS+OVA	1,87 $\pm$ 0,36*	3,71 $\pm$ 0,34
SEA 1ng		
SEA+ PBS	0,04 $\pm$ 0,01	2,07 $\pm$ 0,23
SEA+OVA	2,05 $\pm$ 0,85*	9,69 $\pm$ 0,71* ^δ
SEA 3ng		
SEA+PBS	0,18 $\pm$ 0,02	3,13 $\pm$ 0,29
SEA+OVA	1,86 $\pm$ 0,32*	4,52 $\pm$ 0,71

A contagem de leucócitos foi realizada no LBA obtido 24 h após a instilação intranasal de OVA (1 mg/0,2 mL de PBS) ou PBS no caso de grupos controle. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. provenientes de 5 - 7 animais por grupo. *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle; ^δP < 0,05 comparado ao grupo OVA previamente instilado com PBS.

3.3. Efeito da pré-exposição das vias aéreas à SEA sobre o número de leucócitos presentes no parênquima pulmonar

Nos pulmões de ratos instilados com PBS (grupo controle) notamos que os leucócitos consistiam essencialmente de células mononucleares (93%), sendo discreto o influxo de neutrófilos (aproximadamente 6%) e eosinófilos ($0,40 \pm 0,19 \times 10^6$ eosinófilos/mL; Figura 2, painel A; Tabela 3). O painel B mostra que a pré-exposição com SEA individualmente acarretou um aumento significativo no influxo eosinofílico para o parênquima pulmonar em relação aos animais instilados com PBS. O desafio antigênico com OVA também ocasionou aumento do número de eosinófilos no tecido pulmonar (painel C). No painel D, podemos observar que a pré-exposição à SEA potencializou o acúmulo de eosinófilos no parênquima pulmonar em resposta ao desafio antigênico com OVA (PBS + OVA: $4,78 \pm 0,89 \times 10^6$ eosinófilos/mL; SEA + OVA: $12,47 \pm 1,31 \times 10^6$ eosinófilos/mL; $P=0,001$; Tabela 3). Esses resultados corroboram com os dados obtidos em amostras de LBA de que a pré-exposição à SEA exacerba o influxo de eosinófilos induzido pela OVA em animais sensibilizados. Para os neutrófilos, observamos que tanto a exposição das vias aéreas à SEA ou OVA induz influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar (Tabela 3). O influxo desse tipo celular nos animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA se mostrou exacerbado em relação aos demais grupos (Tabela 3). O número de células mononucleares elevou-se somente no parênquima pulmonar de ratos submetidos ao desafio antigênico com OVA (Tabela 3).

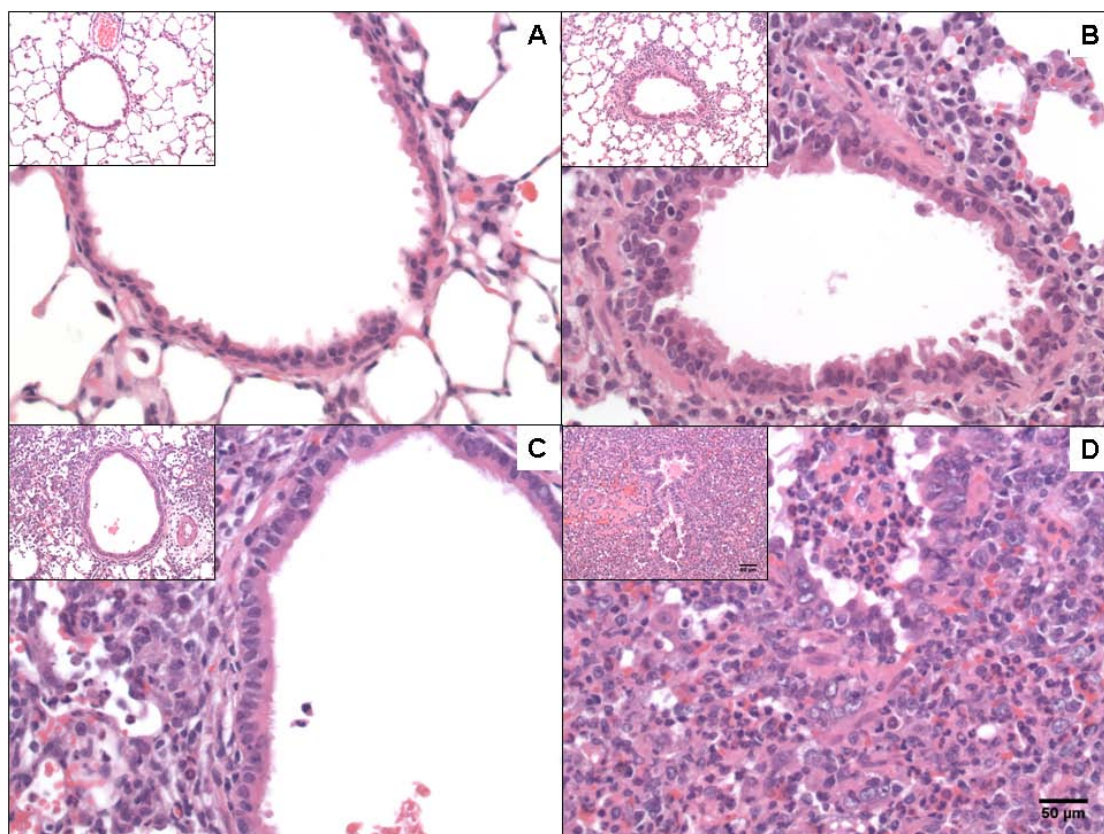


FIGURA 2. Análise histológica do tecido pulmonar de ratos submetidos à pré-exposição das vias aéreas com SEA e desafiados com ovalbumina (OVA). A SEA (3 ng/0.2 mL PBS) foi administrada em animais sensibilizados com OVA, e, 4 horas depois, os animais foram submetidos ao desafio antigênico com OVA. Após 24 horas, os animais foram sacrificados e os pulmões isolados, embebidos em formalina (10%) e posteriormente fixados em parafina. Cortes histológicos com espessura entre 4-5 μ m foram realizados na região do terço médio do aspecto caudal de ambos os pulmões. Os cortes foram corados com H-E. As contagens de leucócitos totais e diferenciais foram realizadas em 3 campos de grande aumento. Painel A: grupo controle instilado com PBS; Painel B: grupo pré-expostos à SEA individualmente; Painel C: grupo previamente instilado com PBS e desafiado com OVA; Painel D: grupo previamente exposto à SEA e desafiado com OVA.

Tabela 3. Número de leucócitos no parênquima pulmonar de ratos pré-expostos à SEA (3 ng) em 24 h após desafio antigênico com ovalbumina (OVA).

Número de células X 10 ⁶ /mL				
	PBS + PBS	PBS + OVA	SEA + PBS	SEA + OVA
Leucócitos Totais	48,86±14,03	152,78±16,14*	58,33 ±7,88	186,80±18,83**
Neutrófilos	2,93±1,05	19,44±3,36*	19,00±3,35*	56,27± 4,52**δ
Eosinófilos	0,40±0,19	4,78±0,89*	4,83±0,40*	12,47±1,31**δ
Mononucleares	45,53±13,04	128,55±14,05*	34,50±5,60	118,06±13,96**

O tecido pulmonar foi coletado 24 horas após a administração intranasal de OVA. Os resultados estão apresentados como média±E.P.M. provenientes de 5 animais por grupo.

*P < 0,05 e **P < 0,05 comparado ao respectivo grupo PBS; δP < 0,05 comparado ao grupo OVA previamente instilado com PBS.

3.4. Efeito da pós-exposição das vias aéreas à SEA sobre o número de leucócitos obtidos no LBA

A figura 3 mostra que, diferentemente da pré-exposição, a SEA, na dose de 3 ng, quando instilada após o desafio antigênico com OVA, não foi capaz de exacerbar o influxo de eosinófilos induzido pela OVA para o LBA. O número de neutrófilos e células mononucleares também não foi alterado pela pós-exposição à SEA em comparação ao grupo desafiado com OVA (OVA+PBS: $1,87 \pm 0,36 \times 10^6$ para neutrófilos/mL e $3,70 \pm 0,30 \times 10^6$ para células mononucleares/mL; OVA+SEA: $2,07 \pm 0,42 \times 10^6$ para neutrófilos/mL e $5,20 \pm 0,40 \times 10^6$ para células mononucleares/mL; n=5 – 7 animais por grupo).

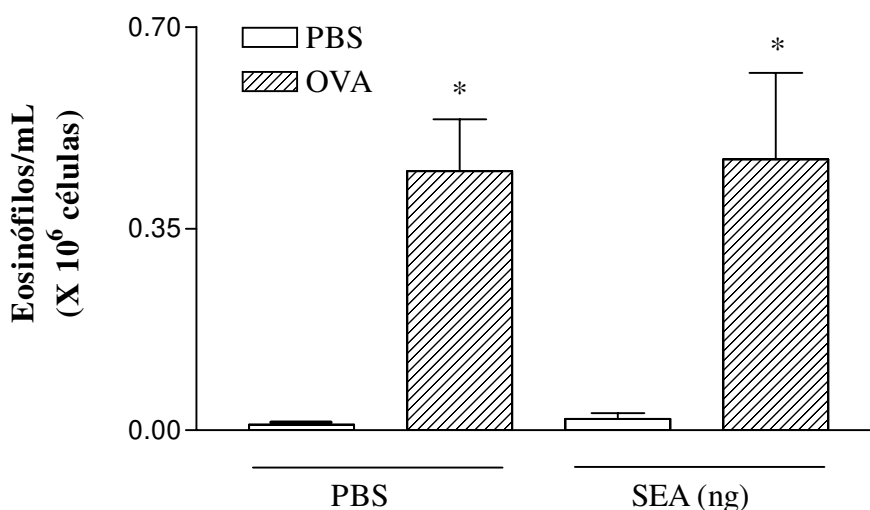


FIGURA 3. Efeito da pós-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (3 ng) no influxo de eosinófilos para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pela ovalbumina (OVA) em 24 h. Animais sensibilizados foram no 14º dia submetidos ao desafio antigênico com OVA, e 4 h após receberam a instilação intranasal de SEA (3 ng/0,2 mL de PBS) ou PBS (0,2 mL) no caso de animais controles. O LBA foi obtido 24 h após a administração de SEA. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. provenientes de 5 – 7 animais por grupo. *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle.

3.5. Efeito da pré-exposição das vias aéreas ao LPS sobre o número de leucócitos obtidos no LBA

A figura 4 (painéis A e B) mostra que a instilação intranasal de LPS, nas doses 0,1 e 1 µg (4 h antes do desafio antigênico com OVA), ocasionou um aumento significativo no número de neutrófilos no LBA em 24 h após o desafio, quando comparado aos animais pré-expostos ao PBS. Esse aumento no influxo de neutrófilos para o LBA ocorreu de maneira dose-dependente, sem afetar o número de eosinófilos (Figura 2, painel B). O número de células mononucleares não foi modificado quando comparado ao grupo controle (PBS+OVA: $3,27 \pm 0,58 \times 10^6$ mononucleares/mL; LPS (0,1 µg)+OVA: $4,05 \pm 0,80 \times 10^6$ mononucleares/mL; LPS (1 µg)+OVA: $4,80 \pm 1,53 \times 10^6$ mononucleares/mL; n=5 e n=11 animais por grupo).

Quando os animais pré-expostos ao LPS foram desafiados com OVA, notamos um aumento no número de neutrófilos no LBA, resultante de um efeito aditivo (Figura 4, painel A).

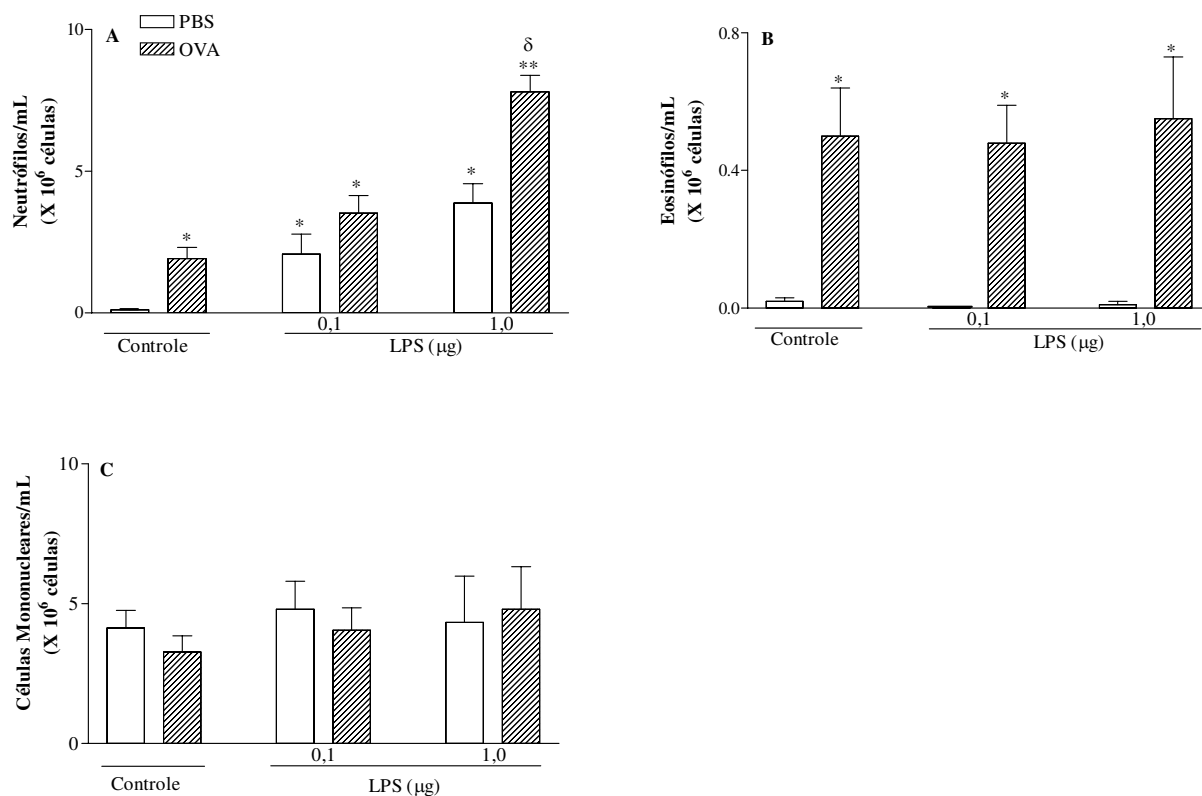


FIGURA 4. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos ao LPS (0,1 e 1 µg) sobre o influxo de neutrófilos (painel A), eosinófilos (painel B) e células mononucleares (painel C) para o lavado broncoalveolar (LBA) induzido pela ovalbumina (OVA) em 24 h. Animais sensibilizados foram submetidos ao desafio antigênico com OVA no 14^o dia, e 4 h depois receberam a instilação intranasal de LPS (0,1 ou 1 µg/0,2 mL de PBS) ou PBS (0,2 mL) no caso de animais controles. O LBA foi obtido 24 h após a administração de OVA. Os resultados estão apresentados como média ± E.P.M. provenientes de 5 – 11 animais por grupo. *P < 0,05 comparado ao respectivo grupo instilado com PBS e ** P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle; ^δP < 0,05 comparado ao grupo OVA previamente instilado com PBS.

3.6. Efeito da pré-exposição das vias aéreas à SEA sobre o número de leucócitos no sangue periférico

A pré-exposição das vias aéreas à SEA (3 ng) ocasiona um influxo aumentado de eosinófilos para o pulmão em 24 h. A partir desse resultado, decidimos avaliar o perfil leucocitário nas amostras de sangue periférico de animais previamente expostos à SEA e desafiados com OVA em 24 h.

A análise dos painéis A, B, C, D e E da figura 5 mostra que a pré-exposição à SEA não alterou significativamente o número de leucócitos totais e diferenciais no sangue periférico em relação aos animais pré-expostos ao PBS, exceto para os eosinófilos no grupo PBS + OVA que se elevaram significativamente em relação ao grupo PBS + PBS (Figura 5, painel B).

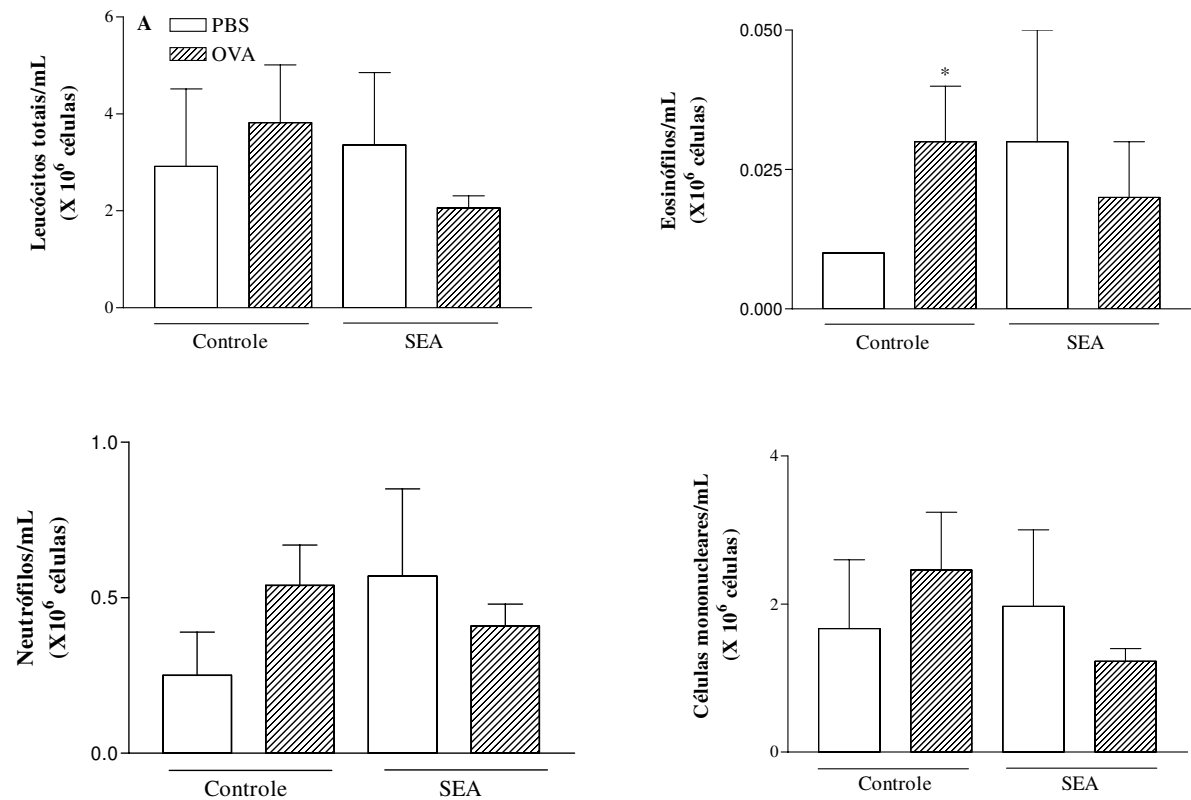


FIGURA 5. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (3 ng) sobre o número de leucócitos totais (painel A), eosinófilos (painel B), neutrófilos (painel C) e células mononucleares (painel D) no sangue periférico obtido após o desafio antigênico com ovalbumina OVA em 24 h. O sangue foi coletado através da aorta abdominal 24 h após a instilação de OVA ou PBS. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. provenientes de 5-7 animais por grupo. *P < 0,05 comparado ao grupo PBS + PBS.

3.7. Efeito da pré-exposição das vias áreas à SEA sobre o número de leucócitos na medula óssea

Nós examinamos também o número de leucócitos na medula óssea de ratos pré-expostos à SEA cujo lavado medular foi obtido 24 h após desafio antigênico com OVA. Conforme apresentado na figura 6 (painel A), o número de neutrófilos não se alterou significativamente em nenhum dos grupos avaliados. No entanto, um aumento significativo no número de eosinófilos foi observado nos animais submetidos ao desafio antigênico com OVA. A pré-exposição à SEA individualmente também aumentou significativamente o número de eosinófilos quando comparado aos animais instilados com PBS (Figura 6, painel B). Observamos ainda que o número de eosinófilos presentes na medula de ratos pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (SEA + OVA) aumentou significativamente em relação ao grupo instilado com SEA individualmente (SEA + PBS).

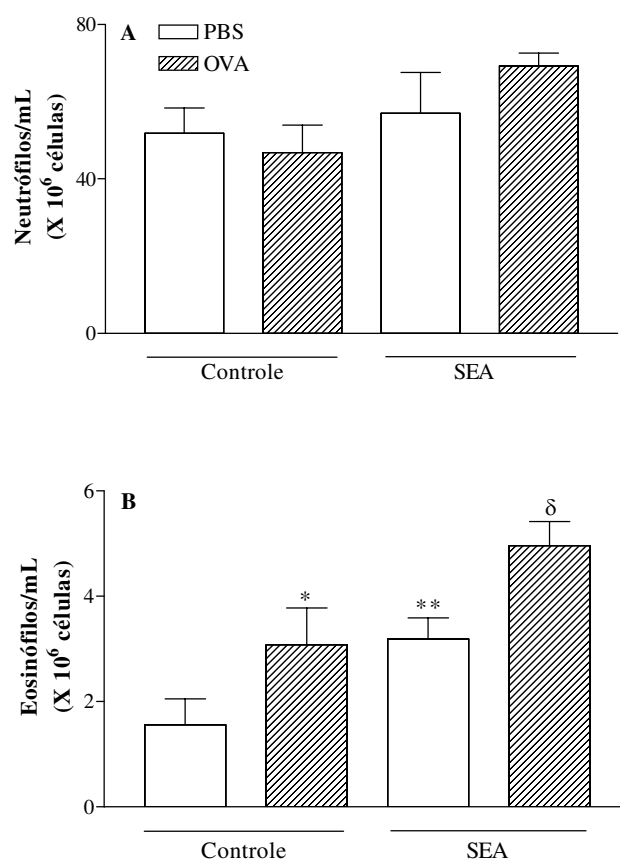


FIGURA 6. Efeito da pré-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (3 ng) no número de neutrófilos e eosinófilos presentes na medula óssea de ratos desafiados com ovalbumina (OVA) em 24 h. A SEA (3 ng) foi administrada em animais sensibilizados com OVA e, 4 horas depois, os animais foram submetidos ao desafio antigênico com OVA. Após 24 h, os animais foram sacrificados e o fêmur direito extraído para a obtenção do lavado medular e realização de contagens total e diferencial de leucócitos. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. provenientes de 5 - 7 animais por grupo. *P < 0,05 comparado ao respectivo controle instilado com PBS; **P < 0,05 em relação ao grupo controle e ^δP < 0,05 em relação aos demais grupos.

3.8. Efeito da pós-exposição das vias áreas à SEA sobre o número de leucócitos na medula óssea

A figura 7, painel B mostra que, diferentemente da pré-exposição, a SEA, na dose de 3 ng, quando instilada após o desafio antigênico com OVA, não aumentou significativamente o número de eosinófilos induzido pela OVA na medula óssea. O número de neutrófilos também não foi alterado em nenhum dos grupos avaliados (Figura 7, painel A).

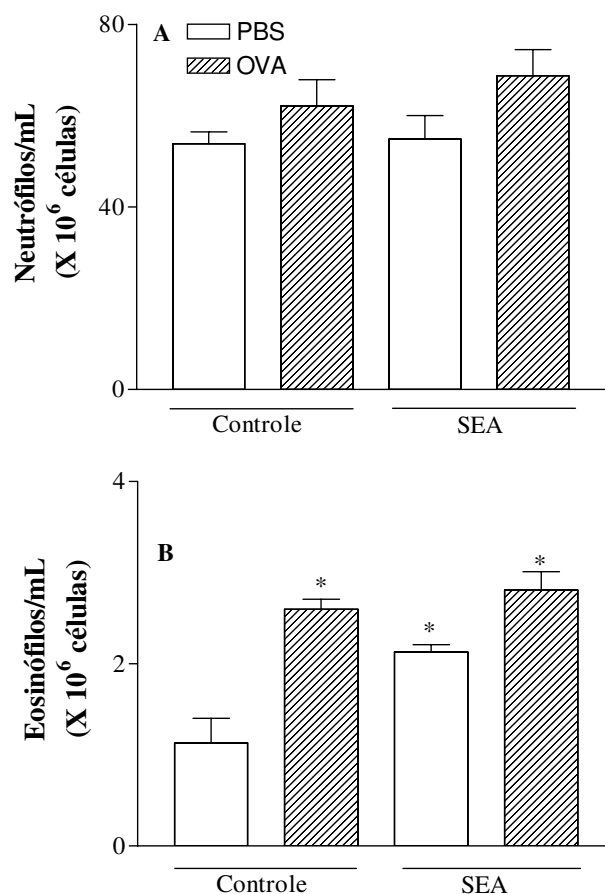


FIGURA 7. Efeito da pós-exposição das vias aéreas de ratos à SEA (3 ng) no número de neutrófilos e eosinófilos presentes na medula óssea de ratos desafiados com ovalbumina (OVA) em 24 h. Animais sensibilizados foram no 14^o dia submetidos ao desafio antigênico com OVA, e 4 h após receberam a instilação intranasal de SEA (3 ng/0,2 mL de PBS) ou PBS (0,2 mL) no caso de animais controles. Após 24 h, os animais foram sacrificados e o fêmur direito extraído para a obtenção do lavado medular e realização de contagens total e diferencial de leucócitos. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. provenientes de 7 animais por grupo. *P < 0,05 comparado ao grupo controle instilado com PBS.

3.9. Efeito da pré-exposição das vias aéreas à SEA sobre os níveis de eotaxina, TNF- α e IL-10 presentes no LBA obtido após o desafio antigênico com OVA (24 h)

Para investigar os mediadores inflamatórios envolvidos na exacerbação do influxo de eosinófilos observado no LBA e no parênquima pulmonar de ratos pré-expostos à SEA e desafiados com OVA, quantificamos as concentrações de eotaxina, TNF- α e IL-10 no LBA (24 h) após desafio antigênico com OVA.

Conforme apresentado na figura 8, o desafio com OVA elevou significativamente os níveis de eotaxina no LBA em relação aos animais instilados com PBS (painel A). Os níveis de eotaxina apresentaram-se ainda mais elevados nos animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (Figura 8, painel A).

Os níveis de TNF- α não se mostraram alterados nem no grupo de animais desafiados com OVA nem no grupo pré-exposto à SEA individualmente (Figura 8, painel B). Entretanto, os níveis dessa citocina apresentaram-se marcadamente elevados nos animais que foram pré-expostos à SEA e desafiados com OVA (Figura 8, painel B).

Os níveis de IL-10 não foram significativamente alterados entre os grupos estudados (Figura 8, painel C).

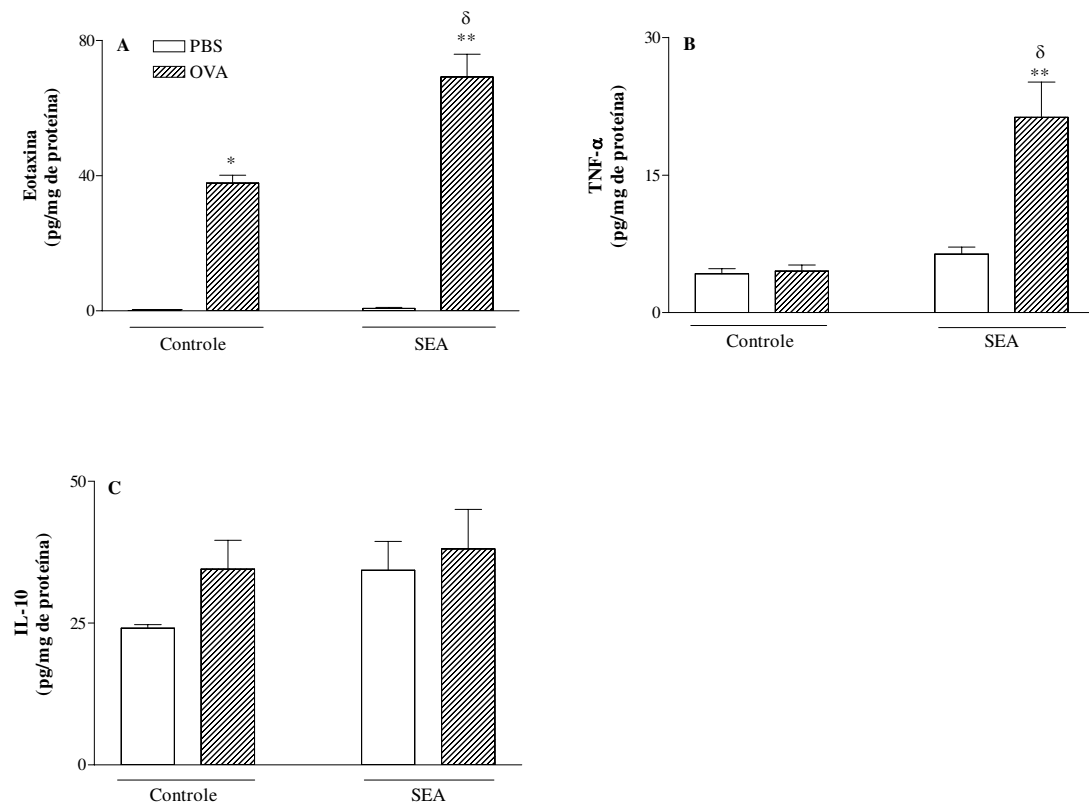


FIGURA 8. Níveis de eotaxina (painel A), TNF- α (painel B) e IL- 10 (painel C) no lavado broncoalveolar (LBA de ratos pré-expostos à SEA e submetidos ao desafio antigênico com ovalbumina (OVA)). A SEA (3 ng/0.2 mL PBS) foi administrada em animais sensibilizados com OVA e, 4 h depois, os animais foram submetidos ao desafio com OVA. O LBA foi obtido 24 horas após a instilação de OVA ou PBS. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. provenientes de 5-7 animais por grupo. *P < 0,05 e **P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle; ^δ P < 0,05 comparado ao grupo que recebeu PBS e foi desafiado com OVA.

3.10. Efeito da estimulação com SEA sobre os níveis de eotaxina em macrófagos alveolares cultivados *in vitro*

Os níveis de eotaxina foram dosados em sobrenadante de macrófagos alveolares isolados de ratos naïve e incubados *in vitro* na presença ou na ausência de SEA (10 µg/mL). A figura 9 mostra que os níveis de eotaxina liberados por macrófagos alveolares incubados com SEA mostraram-se elevados em relação ao grupo controle.

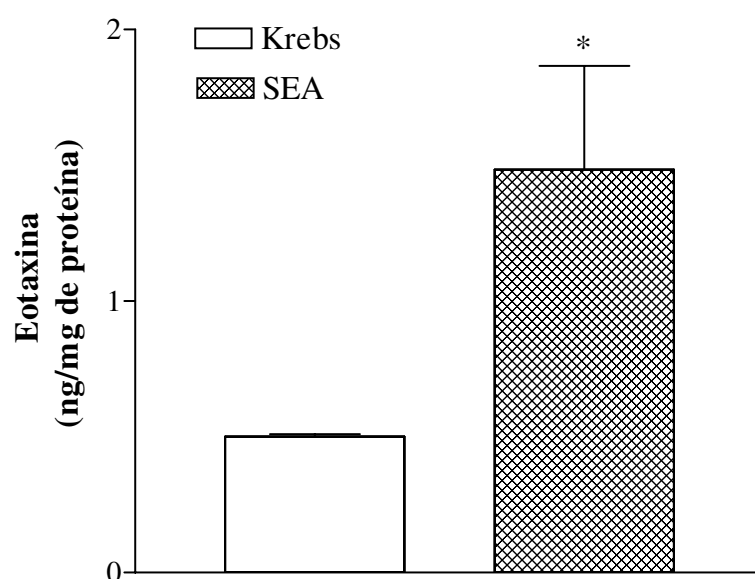


FIGURA 9. Níveis de eotaxina em sobrenadante de macrófagos alveolares estimulados com SEA. Macrófagos alveolares foram isolados a partir do LBA de ratos naïve e incubados *in vitro* com SEA (10 µg/mL) ou Krebs (1 mL). Após 2 h de incubação, o sobrenadante foi coletado e os níveis de eotaxina mensurados. Resultados estão apresentados com média ± E.P.M. provenientes de 8 animais por grupo, sendo que cada amostra foi feita em quadruplicata. * $P < 0,0001$ comparado ao grupo controle.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Este estudo mostra claramente que a pré-exposição das vias aéreas à SEA aumenta o influxo de eosinófilos para o LBA e para o tecido pulmonar de ratos desafiados com OVA. Por outro lado, a pré-exposição das vias aéreas ao LPS (toxina proveniente de bactérias gram-negativas) aumentou o influxo de neutrófilos sem modificar o influxo de eosinófilos.

Conforme descrito na literatura, a exposição de sujeitos asmáticos às enterotoxinas estafilocócicas tem ocasionado potencialização da doença uma vez que esses indivíduos apresentam altos níveis de IgE específicos para as SEs e, conseqüentemente, altos níveis séricos de IgE total, fenômeno que está intimamente relacionado com o quadro de hiperreatividade brônquica entre outros sintomas da asma (Bachert *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005).

Nossos resultados indicam que a enterotoxina estafilocócica do tipo A (SEA) contribui para a exacerbação da resposta pulmonar alérgica observada em humanos. Trabalhos mostraram que as enterotoxinas estafilocócicas dos tipos B, C e D, bem como a TSST-1, são produzidas por cepas *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes humanos com septicemia (Humpheys *et al.*, 1989; Kenny *et al.*, 1993), entretanto, não se observou qualquer correlação entre complicações desse quadro e o tipo de enterotoxina secretada (Kancierski *et al.*, 1996). De qualquer forma, estudos futuros são requeridos para avaliar se outras enterotoxinas estafilocócicas são, à semelhança da SEA, capazes de potencializar a resposta pulmonar alérgica.

O TNF- α é uma citocina produzida por vários tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos TH₁, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, que possui atividades imunorregulatórias (Thomas, 2001). Os níveis sistêmicos e pulmonares dessa citocina apresentam-se elevados em animais alérgicos e em humanos com asma

brônquica. Nos pulmões, o TNF- α é sintetizado e estocado, principalmente, em mastócitos e macrófagos alveolares, podendo ser secretado via mecanismos dependentes de IgE (Russo e Polosa, 2005). Em nosso estudo, os níveis de TNF- α mostraram-se marcadamente elevados no LBA de ratos pré-expostos à SEA e desafiados com OVA, sugerindo um importante papel dessa citocina na exacerbação do influxo eosinofílico em infecções concomitantes ao quadro alérgico. O TNF- α está envolvido no recrutamento de leucócitos, pois promove aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais e induz a síntese de outras citocinas e quimiocinas (Kips, 2001). Além disso, tem-se mostrado que o TNF- α induz a síntese de eotaxina em vários tipos celulares, incluindo fibroblastos, células do epitélio pulmonar humano, monócitos, células endoteliais e eosinófilos humanos (Bartels *et al.*, 1996; Lilly *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1998; Matsukura *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2002).

A eotaxina é uma CC-quimiocina responsável pela quimiotaxia seletiva e migração transendotelial de eosinófilos para as vias aéreas de sujeitos alérgicos (Lamkhieoued *et al.*, 1997; Minshall *et al.*, 1997; Taeto *et al.*, 2004; Haley *et al.*, 2008). Acredita-se que a eotaxina e a IL-5 agem sinergicamente no recrutamento de eosinófilos para o tecido pulmonar inflamado (Palframan *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007). Além disso, Young *et al.* (1999) mostraram que o aumento no número de eosinófilos no LBA de macacos alérgicos correlaciona-se com os altos níveis de eotaxina. Em nosso estudo, conforme esperado, uma elevação significativa nos níveis de eotaxina foi observada no LBA de ratos desafiados com OVA. Esses níveis apresentaram-se ainda mais elevados no LBA de ratos pré-expostos à SEA e desafiados com OVA. Além disso, a incubação de macrófagos isolados com SEA ocasionou liberação significativa de TNF- α (Desouza *et al.*, 2005). Isso sugere fortemente que o TNF- α secretado pelo macrófago atua na liberação de eotaxina, agravando o influxo

eosinofílico observado nos animais alérgicos pré-expostos à SEA. Os níveis de eotaxina não se mostraram alterados no LBA de animais somente expostos à SEA (mas não desafiados com OVA), que é consistente com os níveis de TNF- α os quais também não se mostraram alterados no LBA de 24 h desse mesmo grupo experimental.

O aumento do infiltrado eosinofílico observado nas vias aéreas de ratos pré-expostos à SEA não foi reproduzido no protocolo em que a enterotoxina foi administrada 4 horas após o desafio antigênico com OVA. Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório mostraram que a exposição das vias aéreas de ratos não alérgicos a SEA e SEB causa inflamação pulmonar aguda em 4 horas, sendo a mesma caracterizada por grande influxo de neutrófilos, o qual é acompanhado pelo aumento nos níveis de vários mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α (Desouza et al. 2005; 2006). Portanto, a prévio contato das vias aéreas com a SEA parece ser crucial para permitir que o estado pró-inflamatório se instale, promovendo aumento na produção de TNF- α , e, conseqüentemente, exacerbação da resposta ao alérgeno.

Várias evidências mostram que a citocina IL-10 atua sobre monócitos e macrófagos reduzindo a expressão e os níveis de TNF- α , estando esse evento associado à proteção e redução clínica de doenças pulmonares (Wood *et al.*, 1998). Entretanto, nossos resultados mostram que a elevação dos níveis de TNF- α no LBA (ratos pré-expostos à SEA e 4 h depois desafiados com OVA) não foi acompanhada pela elevação concomitante nos níveis de IL-10. Isto sugere que essa citocina não promove regulação negativa nesse tipo de inflamação pulmonar alérgica.

Está bem estabelecido que a medula óssea desempenha um papel importante na resposta inflamatória alérgica (Wood *et al.*, 2002). Os eosinófilos são granulócitos derivados de precursores mielóides localizados na medula óssea, em resposta à ativação promovida por citocinas e, na presença de estímulos apropriados, esses eosinófilos são

liberados na circulação sanguínea e recrutados para os tecidos inflamados. Evidências indicam que várias vias estão envolvidas nesse processo, incluindo estímulo de células residentes na medula óssea, secreção de fatores de crescimento hematopoiético induzida por alérgenos e recrutamento de células (Möhler *et al.*, 1997). IL-5, eotaxina e moléculas de adesão como VLA-4 e VCAM desempenham papel importante nesse processo (Papayannopoulou *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2002). Em nosso estudo, observamos um aumento significativo no número de eosinófilos presentes na medula óssea de ratos desafiados com OVA em 24 h, confirmando estudos prévios realizados em ratos (Chin *et al.*, 1998), camundongos (Gaspar-Elsas *et al.*, 1997) e sujeitos asmáticos após a inalação de alérgeno (Möhler *et al.*, 1997). Nos animais expostos à SEA somente, observamos também um aumento significativo no número de eosinófilos na medula óssea, sendo esse efeito potencializado nos animais pré-expostos à SEA e desafiados com OVA. É claro que a exposição das vias aéreas à alérgenos promove proliferação e diferenciação de células progenitoras presentes na medula óssea (Ohkawara *et al.*, 1997; Tomaki *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2000), entretanto, nosso estudo é o primeiro a mostrar que a SEA individualmente promove eosinopoiese quando administrada via intranasal. Interessantemente, no protocolo de pós-exposição à SEA não observamos alteração nos valores de eosinófilos e neutrófilos, dados estes que corroboram com aqueles do LBA. Portanto, alterações no padrão de eosinófilos presentes na medula óssea podem desempenhar um papel importante na exacerbação do influxo de eosinófilos para as vias aéreas de ratos pré-expostos à SEA e desafiados com OVA.

Não observamos eosinofilia nas amostras de sangue coletados de animais pré-expostos à SEA. Embora isto não nos seja claro, é provável que tenha havido um trânsito muito rápido desse granulócito da medula óssea para as vias aéreas, não

permitindo um acúmulo dessa célula no tecido sanguíneo. É possível que modificações do padrão celular sanguíneo tenham ocorrido em tempos anteriores.

Evidências epidemiológicas sugerem que a exposição ao LPS pode influenciar o desenvolvimento e a gravidade da asma (Michel, 2003). Por isso, em nosso estudo, investigamos também os efeitos da pré-exposição das vias aéreas ao LPS a fim de se estabelecer uma comparação com os efeitos obtidos pela pré-exposição à toxinas oriundas de gram-negativas e de gram-positivas (SEA). Endotoxina tem tanto o potencial de suprimir o desenvolvimento da asma, via ativação de células do tipo TH₁, quanto o de potencializar a gravidade da asma, presumivelmente via atividades pró-inflamatórias (Liu, 2002). No presente estudo, notamos que a pré-exposição das vias aéreas de ratos ao LPS individualmente ou quando seguido de desafio antigênico com OVA, não modifica o número de eosinófilos no LBA. Esse resultado corrobora com estudos prévios mostrando que a exposição das vias aéreas a doses baixas de LPS (0,3 µg) causa efeitos mínimos no recrutamento de eosinófilos em camundongos, enquanto que o recrutamento significativo é obtido com a administração de doses elevadas de LPS (15-25 µg); ou seja, nesse caso, observa-se uma acentuada inflamação eosinofílica (Stephens e Chaplin, 2002; Lundy *et al.*, 2003). Reutershan *et al.* (2005) observaram que a endotoxina mobiliza neutrófilos via ativação de receptores do tipo “toll-like” 4 (TLR-4), estando esse efeito reduzido em camundongos mutantes para TLR-4 (Savov *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2006). Conforme apresentado em nossos resultados, o LPS causa um influxo de neutrófilos para as vias aéreas de maneira dose-dependente, sendo esse aumento ainda maior em ratos desafiados com OVA. Se o influxo de neutrófilos ocasionado pelo LPS em ratos desafiados ou não com OVA é reflexo da ativação das vias de sinalização do receptor TLR-4 requer estudos adicionais.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a pré-exposição das vias aéreas à SEA em ratos desafiados com OVA ocasiona aumento no número de eosinófilos tanto na medula óssea quanto no LBA, sendo provavelmente regulados por aumento na síntese de TNF- α e eotaxina. O esclarecimento dos mecanismos pelos quais estas toxinas exacerbam respostas inflamatórias alérgicas poderá ser de fundamental importância para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de asma brônquica, especialmente aquelas precedidas por infecção pulmonar causada por bactérias gram-positivas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bachert C, Gevaert P, Van Cauwenberge P. Staphylococcus aureus enterotoxins: a key in airway disease? *Allergy*. 2002; 57: 480-487.

Bachert C, Gevaert P, Van Cauwenberge P. *Staphylococcus aureus* superantigens and airway disease. *Curr. Allergy. Asthma. Rep.* 2003; 2: 252-258.

Bachert C, Zhang N, Patou J, Van Zele T, Gevaert P. Role of staphylococcal superantigens in upper airway disease. *Curr. Opin. Allergy and Clin. Immunol.* 2008; 8: 34-38.

Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 61: 1-10.

Bartels J, Schluter C, Richter E, Nosso N, Kulke R, Christophers E, Schröder JM. Human dermal fibroblasts express eotaxin: molecular cloning, mRNA expression, and identification of eotaxin sequence variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 225: 1045-51.

Bartlett NW, Walton RP, Edwards MR, Aniscenko J, Caramori G, Zhu J, Glanville N, Choy KJ, Jourdan P, Burnet J, Tuthill TJ, Pedrick MS, Hurle MJ, Plumpton C, Sharp NA, Bussell JN, Swallow DM, Schawarze J, Guy B, Almond JW, Jeffery PK, Lloyd CM, Papi A, Killington RA, Rowlands DJ, Blair ED, Clarke NJ, Johnston S. Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation. *Nature Medicine*. 2008; 14 (2): 199-204.

Bergdoll MS, Czop JK, Gould SS. Enterotoxin synthesis by the staphylococci. *Ann N Y Acad Sci.* 1974; 236: 307-16.

Bergdoll MS. In: **Staphylococci and staphylococcal infections**. Reimann H and Bryan FL. London: Academic Press;1989.462-512.

Bergdoll MS, Chesney PJ. In: **Toxic shock syndrome**. Bergdol MS and Chesney PJ. Boston: CRC press; 1991. 51-73.

Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, Brasholt M, Heltberg A, Vissing NH, Thorsen SV, Stage M, Bressen C. Childhood asthma after bacterial colonization of airway in neonates. *New England J. Med.* 2007; 357: 1487-95.

Bloemen K, Verstraelen S, Heuvel RVD, Witters H, Nelissen I, Schoeters G. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology Letters*. 2007; 113: 6-18.

Bobak DA, Guerrant RL. New developments in enteric bacterial toxins. *Adv Pharmacol.* 1992; 23: 85-101.

Bochner BS, Busse WW. Allergy and asthma. *J allergy Clin Immunol.* 2005; 115: 953-9.

Busse WW, Lemanske Jr RF. Asthma. *The New England Journal of Medicine.* 2001; 344: 350-362.

Chin JE, Winterrowd GE, Hatfield CA, Brashler JR, Griffin RL, Vonderfecht SL, Kolbasa KP, Fidler SF, Shull KL, Krzesicki RF, Rady KA, Dunn CJ, Sly LM, Staite ND, Richards IM. Involvement of intercellular adhesion molecule-1 in the antigen-induced infiltration of eosinophils and lymphocytes into the airways in a murine model of pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998; 18:158-67.

Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax.* 1999; 54: 825-857.

Clark K, Simson L, Newcombe N, Koskinen AML, Mattes J, Lee N, Lee J, Dent LA, Matthaei KI, Foster PS. Eosinophil degranulation in the lung of mice primarily occurs in the airway lumen. *J. Leukocyte Biology*.2004; 75: 1001-1009.

Conran N, Ferreira HHA, Metze LI, Tomazzi SM, Antunes E, Denucci G. Nitric oxide regulates human eosinophil adhesion mechanisms *in vitro* by changing integrin expression and activity in the eosinophil cell surface. *Br J Pharmacol*. 2001; 134: 632 -638.

Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and the attraction of eosinophil to the asthmatic lung. *Respiratory Research*. 2001; 2: 150-156.

Costa GG, Silva RM, Franco-Penteado CF, Antunes E, Ferreira HHA. Interactions between eotaxin and interleukin-5 in the chemotaxis of primed and non-primed human eosinophils. *Eur. J. Pharmacol*. 2007; 566: 200-5.

Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumor necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol*. 1992; 107: 660-664.

Desouza IA, Ribeiro-Dasilva G. Resident macrophages modulate the neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin B into mouse peritoneal cavity. *J. Nat. Toxins*. 1996; 5: 341-350.

Desouza IA, Ribeiro-Dasilva G. The pharmacological profile of mouse hind paw inflammation induced by staphylococcal enterotoxin type A. *Inflamm. Res*. 1997; 46: 361-365.

Desouza IA, Ribeiro-Dasilva G. Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis. *Eur. J. Pharmacol*. 1998; 363: 189-195.

Desouza IA, Hyslop S, Franco-Penteado CF, Ribeiro-Dasilva G. Mouse macrophages release a neutrophil chemotactic mediator following stimulation by staphylococcal enterotoxin type A. *Inflamm. Res.* 2001; 50: 206-212.

Desouza IA, Hyslop S, Franco-Penteado CF, Ribeiro-Dasilva G. Evidence for the involvement of a macrophage-derived chemotactic mediator in the neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxin B in mice. *Toxicon.* 2002; 40: 1709-1717.

Desouza IA, Franco-Penteado CF, Camargo EAP, Lima CSP, Teixeira SA, Muscará MN, Denucci G, Antunes E. Inflammatory mechanisms underlying the rat pulmonary neutrophil influx induced by airway exposure to staphylococcal enterotoxin type A. *British Journal of Pharmacology.* 2005; 146: 781-791.

Desouza IA, Franco-Penteado CF, Camargo EA, Lima CSP, Teixeira SA, Muscará MN, Denucci G, Antunes E. Acute pulmonary inflammation induced by exposure of the airways to staphylococcal enterotoxin type B in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2006; 217: 107-113.

Dinarello CA. - The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of septic shock syndrome. *J. Infect. Dis.* 1991; 163: 1177-1184.

Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax.* 2002; 57: 643-648.

Egan RW, Athwahl D, Chou CC, Emtage S, Jehn C-H, Kung TT, Mauser PJ, Murgolo NJ, Bodmer MW. Inhibition of pulmonary eosinophilia and hyperreactivity by antibodies to interleukin-5. *Int. Arch Allergy Immunol.* 1995; 107: 321-322.

Eisenbarth S, Piggot DA, Huleatt W, Visitin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like Receptor 4-dependent T Helper Cell Type 2 Responses to Inhaled Antigen. *J. Exp. Med.* 2002; 196 (12): 1645–1651.

Ferreira SH. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs.* 1993; 46: 1-9.

Ferreira HHA, Lodo MLS, Martins AR, Kandratavicius L, Salaroli AF, Conran N, Antunes E, Denucci G. Expression of nitric oxide synthases in vitro migration of eosinophils from allergic rhinitis subject. *Eur J Pharmacol.* 2002; 442: 155-62.

Ferreira HHA, Costa RAO, Jacheta JM, Martins AR, Medeiros MV, Macedo-Soares MF, DeLuca IMS, Antunes E, Denucci G. Modulation of eosinophil migration from bone marrow to lungs of allergic rats by nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 68: 631-639.

Florquin S, Amraoui Z, Dubois C, Decuyper J, Goldman M. The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 1153-1158.

Foster PS. STAT6: an intracellular target for the inhibition of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29: 12-16.

Franco-Penteado CF, Desouza IA, Teixeira SA, Ribeiro-DaSilva G, Denucci G, Antunes E. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. *Biochem Pharmacol.* 2001; 61: 1305-311.

Gaspar-Elsas MI, Joseph D, Xavier-Elsas P, Vargaftig BB. Rapid increase in bone marrow eosinophil production and responses to eosinopoietic interleukins triggered by intranasal allergen challenge. *Amer. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 1997;17: 404-413.

Giembycz MA, Lindsay MA. Pharmacology of the Eosinophil. *Pharm. Rev.*, 51: 213-339, 1999.

Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105: 651-63, 2000.

Gonglur U, Efeoglu T. Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes. *Cell Tissue Res.* 2004; 318: 473-482.

Gonzalo JA, Baixeras E, Gonzáles-Garcia A, George-Chandy A, Van Rooijen N, Martínez AC. Differential *in vivo* effect of superantigen and an antibody targeted to the same T cell receptor: activation-induced cell death vs. Passive macrophage-dependent deletion. *J. Immunol.* 1994; 152: 1597-1608.

Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TNC, Proudfoot A, Martinez AC, Dorf M, Bjerke T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J. Exp. Med.* 1998; 188:157-167.

Haley KJ, Sunday ME, Porrata Y, Kelley C, Twomey A, Shahsafaei A, Galper B, Sonna LA, Lilly CM. Ontogeny of the eotaxins in the human lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008; 294: L214-24.

Hamelmann E, Takeda K, Schwartz J. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1999; 21: 480-489.

Haskó G, Virág L, Egnaczyk G, Salzman AL, Szabó C. The crucial role of IL-10 in the suppression of the immunological response in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 1417-1425.

Hellings PW, Hens G, Meyts I, Vanoirbeek J, Gevaert P, Jorissen M, Ceuppens JL, Bachert C. Aggravation of bronchial eosinophilia in mice by nasal and bronchial exposure to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Clinical and Experimental Allergy*. 2006; 36: 1063-1071.

Herz U, Rückert R, Wollenhaupt K, Tschernig T, Neuhaus-Steinmetz U, Pabst R, Renz H. Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness – a model for non-allergic asthma. *European Journal Pharmacology*. 1999; 29: 1021-1031.

Hogan SP, Rosenerg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB, Rothenberg ME. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38: 709-50.

Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. 1999; 402 (25): B12-B17.

Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ, Friend DS, Xanthou G, McKenna EE, Ghiran S, Gerard NP, Yu C, Orkin SH, Gerard C. A Critical role for eosinophils in allergic airways remodelling. *Science*. 2004; 305: 1776-79.

Humphreys H, Keane CT, Hone R, Pomery H, Russel RJ, Arbuthnott JP, Coleman DC. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolates from cases of septicaemia and from healthy carriers. *J. Med. Microbiol.* 1989; 28 : 163-72.

Iandolo JJ. - Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annual Rev. Microbiol.* 1989; 43: 375-402.

Jung YW, Schoeb TR, Weaver CT, Chaplin DD. Antigen and lipopolysaccharide play synergistic roles in the effector phase of airway inflammation in mice. *Am J Pathol.* 2006; 168: 1425-34.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1999. 427 p.

Kancłerski K, Söderquist B, Kjellgren M, Holmberg H, Möllby R. Serum antibody response to *Staphylococcus aureus* enterotoxins and TSST-1 in patients with septicaemia. *J. Med. Microbiol.* 1996; 44: 171-7.

Kay AB, Klion AD. Anti-interleukin-5 therapy for asthma and hypereosinophilic syndrome. *Immunol.Allergy Clin. North Am.* 2004; 14 (4): 645-666.

Kenny K, Reiser RF, Batisda-Corcuera FD, Norcross NL. Productions of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 706-7.

Kips JC. Cytokines in asthma. *Eur. Resp. J.* 2001; 18: 24s-33s.

Kluger MJ. Fever, role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.* 1991; 71: 93-127.

Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Watnick AS, Jones H, Mauser PJ, Fernandez X, Umland S, Kreutner W, Chapman RW, Egan RW. Mechanisms of allergic pulmonary eosinophilia in the mouse. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 94: 1217-1224.

Lamkhioed B, Renzi PM, Abi-Younes S, Garcia-Zepeda EA, Allakhverdi Z, Ghaffar O, Rothenberg MD, Luster AD, Hamid QJ. Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *Immunology.* 1997;159: 4593-601.

Lampinen M, Carlson M, Hakansson LD, Venge P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy.* 2004; 59:793-805.

Laouini D, Kawamoto S, Yalcindag A, Bryce P, Mizoguchi E, Oettgen H, Geha R. Epicutaneous sensitization with superantigen induces allergic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003; 112: 981-987.

Lee JH, Lin YT, Yang YH, Wang LC, Chiang BL. Increased levels of serum-specific immunoglobulin E to Staphylococcal enterotoxin A and B in patients with allergic rhinitis and bronchial asthma. *Int. Arch. of Allergy and Immunol.* 2005; 138:305-311.

Lemanske RF, Busse WW. Asthma: factors underlying inception, exacerbation, and disease progression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117: S456-61.

Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA. The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 435-466.

Lilly CM, Nakamura H, Kesselman H, Nagler-Anderson C, Asano K, Garcia-Zepeda A, Rothenberg ME, Drazen JM, Luster AD. Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 1767-73.

Linardi A, Costa SKP, Dasilva GR, Antunes A. Involvement of kinins, mast cells and sensory neurons on the plasma exudation and paw oedema induced by staphylococcal enterotoxin B in the mouse. *European Journal of Pharmacology*. 2000; 399: 235-242.

Lintomen L, Gaspar Elsas MIC, Maximiano ES, Paula-Neto HA, Vargaftig DJBB, Elsas PX. Allergic sensitization prevents upregulation of haemopoiesis by cyclo-oxygenase inhibitors in mice. *Brit. J. Pharmacol*. 2002; 135: 1315-1323.

Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109: 379-92.

Lundy SK, Berlin AA, Lukacs NW. Interleukin-12-independent downmodulation of cockroach antigen-induced asthma in mice by intranasal exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol*. 2003; 163: 1961-8.

Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*. 1990; 248: 705-11.

Matsukura S, Stellato C, Plitt JR, Bickel C, Miura K, Georas SN, Casorale V, Scheimer RP. Activation of eotaxin gene transcription by NF-kappa B and STAT 6 in human airway epithelial cells. *J. Immunol*. 1999; 163: 6876-83.

Medeiros MV, Macedo-Soares MF, De-Luca IMS, Hyslop S, Denucci G, Antunes E. Contribution of C-fibres to leucocyte recruitment in bronchoalveolar lavage fluid and pleural cavity in rat. *Eur J Pharmacol*. 2001; 421:133–140.

Medeiros MV, De-Luca IMS, Bricola AAO, Zanesco A, Denucci G, Antunes E. Enhanced airways responsiveness in rats depleted of sensory neuropeptides by neonatal capsaicin treatment. *Neurosci Lett*. 2003; 341:103–106.

Michel O. Role of lipopolysaccharide (LPS) in asthma and other pulmonary conditions. *J Endotoxin Res*. 2003; 9: 293-300.

Micusan VV, Thibodeau J. Superantigens of microbial origin. *Seminars in Immunology*. 1993; 5: 3-11.

Miethke T, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med*. 1992; 175: 91-98.

Miller M, Sung KLP, Muller WA, Cho JY, Roman M, Castaneda D, Nayar J, Condon T, Kim J, Sriramarao P, Broide DH. Eosinophil tissue recruitment to sites of allergic inflammation in the lung is platelet endothelial cell adhesion molecule independent. *Journal of Immunology*. 2001; 167: 2292-2297.

Minshall EM, Cameron L, Lavigne F, Leung DY, Hamilos D, Garcia-Zepeda EA, Rothenberg M, Luster AD, Hamid QJ. Eotaxin mRNA and protein expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal response in seasonal allergic rhinitis. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol*. 1997; 17: 683-90.

Möhler R, Salemi P, Moore MAS, Rafii S. Expression of interleukin-5 by human bone marrow microvascular endothelial cells: implications for the regulation of eosinophilopoiesis in vivo. *Br J Haematol*. 1997; 99: 732-8.

Morrison DF, Foss DL, Murtaugh MP. Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* 2000; 68: 4752-4758.

Müller-Alouf H, Varnoy C, Simonet M, Alouf JE. Superantigen bacterial toxins: state of the art. *Toxicon.* 2001;39: 1691-1701.

Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 1998; 66: 3337–3348.

Murray CS, Simpson A, Custovic A. Allergens, viruses, and asthma exacerbations. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004; 1: 99-104.

Nakamura H, Haley KJ, Nakamura T, Luster AD, Lilly CM. Differential regulation of eotaxin expression by TNF- α and PMA in human monocytes U-937 cells. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: L601-10.

Neumann B, Engelhardt B, Wagner H, Holzamann B. Induction of acute inflammatory lung injury by staphylococcal enterotoxin B. *J. Immunol.* 1997; 158: 1862-1868.

O'byrne PM, Gauvreau GM, Wood LJ. Interaction between haemopoietic regulation and airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy.* 1999; 29 (2): 27-32.

Ohkawara Y, Lei XF, Stämpfli MR, Marshall JS, Xing Z, Jordana M. Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation. *Am J Respir.* 1997; 16: 510-20.

Ono HK, Omoe K, Imanishi K, iwakabe Y, Hu DL, Kato H, Saito N, Nakame A, Uchiyama T, Shinagawa K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. *Infect Immun.* 2008; 76: 4999-5005.

Orwin P. M.; Leung, D. Y.; Donahue, H. L.; Novick, R. P.; Schlievert, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.*, 69: 360-366, 2001.

Palframan RT, Collins PD, Williams TJ, Rankin SM. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood.* 1998; 91: 2240-8.

Papayannopoulou T, Priestley YGV, Nakamoto B. Anti-VLA4/VCAM-1-induced mobilization requires cooperative signaling through the kit/mkit ligand pathway. *Blood.* 1998; 7: 2231-9.

Pease JE, Williams TJ. Eotaxins and asthma. *Curr. Opin. in Pharmacol.* 2001; 1: 248-253.

Petrolani M, Lefort J, Vargaftig BB. Active immunization induces lung hyperresponsiveness in the guinea pig. Pharmacologic modulation and triggering role of the booster injection. *Amer. Rev. Respir. Dis.* 1988;138: 1572-1578.

Powell WS, Ahmed S, Gravel S, Rokach J. Eotaxin and RANTES enhance 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced eosinophil chemotaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107: 272-278.

Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 133: 299-306.

Prussin C, Metcalfe DD. IgE, Mast cell, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117(2): 450-456.

Rankin SM, Conroy DM, Williams TJ. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today*. 2000; 6: 20-7.

Renz H, Herz U. The bidirectional capacity of bacterial antigens to modulate allergy and asthma. *Eur. Respir. J*. 2002; 19: 158-171.

Renz H, Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irbin CG, Gelfand EW. Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. *J. Allergy Clin. Immunol*. 1992; 89: 1127-1138.

Reutershan J, Basit A, Galkina EV, Ley K. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 289: L807-15.

Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophils trafficking in allergy and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2007; 119: 1303-10.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol*. 2006; 24: 147 -174.

Russo C, Polosa R. TNF- α as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clinical science*. 2005; 109: 135-142.

Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA. Effects of reactive oxygen and nitrogen metabolites on RANTES- and IL-5-induced eosinophil chemotactic activity *in vitro*. *Am. J. Pathol*. 1999; 155: 591-598.

Savov JD, Gavett SH, Brass DM, Costa DL, Schwartz DA. Neutrophils play a critical role in development of LPS-induced airway disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 283: L952-62.

Shahabuddin S, Ponath P, Schleimer RP. Migration of eosinophils across endothelial cell monolayers: interactions among IL-5, endothelial-activating cytokines, and C-C chemokines. *J. Immunol*. 2000; 164: 3847-3854.

Silva JRL, Silva MDP, Lefort J, Vargaftig BB. Endotoxins, asthma, and allergic immune response. *Toxicology*. 2000; 152: 31-35.

Smith N, Johnson FJ. Effects of inhaled eotaxin on the airway function and inflammatory cell influx in sensitised and non-sensitised guinea pigs. *Pulm. Pharmacol. Ther*. 2006; 19: 391-6.

Stephens R, Chaplin DD. IgE cross-linking or lipopolysaccharide treatment induces recruitment of TH2 cells to the lung absence of specific antigen. *J Immunol*. 2002; 169: 5468-76.

Tateno H, Nakamura H, Minematsu N, Nakajima T, Takahashi S, Nakamura M, Fukunaga K, Asano K, Lilly CM, Yamaguchi K. Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid. *Resp. Med*. 2004; 98: 782-90.

Tessier PA, Naccache PH, Diener KR, Glaude RP, Neote KA, Clark-Lewis I, Mccoll SR. Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens: II. Critical role for chemokines, ICAM-1, and TNF- α . *J Immunol*. 1998; 161: 1204-211.

Thomas PS. Tumor necrosis factor- α : the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol. Cell. Biol*. 2001; 79: 132-40.

Tillie-Leblond I, Gosset P, Tonnel AB. Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy*. 2005, 60: 23-29.

Tomaki M, Zhao LL, Lundahl J, Sjöstrand M, Jordana M, Lindén A, O'Byrne P, Lötval J. Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 receptor alpha. *J Immunol*. 2000; 165: 4040-50.

Vargaftig BB. What can we learn from murine models of asthma? *Clin. Exp. Allergy*. 1999; 29 (1): 9-13.

Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 1999; 160: 1001-1008.

Won SJ, Huang WT, Lai YS, Lin TM. Staphylococcal enterotoxin A acts through nitric oxide synthase mechanisms in human peripheral blood mononuclear cells to stimulate synthesis of pyrogenic cytokines. *Infection and Immunity*. 2000; 68: 2003-2008.

Wong CK, Zhang JP, Ip WK, Lam CWK. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B in tumor necrosis factor-induced eotaxin release of human eosinophils. *Clin. Exp. Immunol*. 2002; 128: 483-9.

Wood LJ, Inman MD, Watson RM, Foley R, Denburg JA, O'Byrne PM. Changes in bone marrow inflammatory cell progenitors after inhaled allergen in asthmatic subjects. *Am J Resp Care Med*. 1998; 157: 99-105.

Wood LJ, Sehmi R, Dorman S, Hamid Q, Tulic MK, Watson RM, Foley R, Wasi P, Denburg JA, Gauvreau G, O'Byrne PM. Allergen-induced increases in bone marrow T lymphocytes and interleukin-5 expression in subjects with asthma. *Am J Resp Care Med*. 2002; 166: 883-9.

Ying S, Zhang G, GU S, Zhao J. How much do know about atopic asthma: Where are we now?. *Cell Mol. Immunol*. 2006; 3 (5): 321-332.

Young SS, Ritacco G, Skeans S, Chapman RW. Eotaxin and nitric oxide production as markers of inflammation in allergic monkeys. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 120: 209-17.

Zamoysca R. Superantigens: Superantigenalers?. *Science's STKE*. 2006; 358: 45-47.

Zhang L, Plow EF. Overlapping, but Not Identical, Sites Are Involved in the Recognition of C3bi, Neutrophil Inhibitory Factor, and Adhesive Ligands by the aMb2 Integrin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271 (30): 18211-18216.

7. Anexo



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

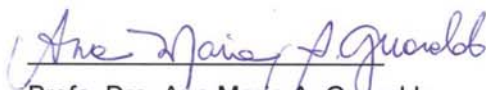
Certificamos que o Protocolo nº 1056-1, sobre "ESTUDO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA PULMONAR ALÉRGICA EM RATOS EXPOSTOS À ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes / Nádia Sabrina Mariano, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 31 de julho de 2006.

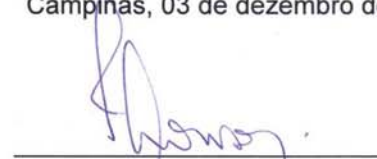
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1056-1, entitled "EXACERBATION OF PULMONARY ALLERGIC INFLAMMATION AFTER RAT AIRWAYS EXPOSITION WITH STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXINS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on July 31, 2006.

Campinas, 03 de dezembro de 2007.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva